

THESIS / THÈSE

DEA EN PHYSIQUE ET CHIMIE DES MATÉRIAUX

Etude d'un biocapteur modèle par spectroscopie de génération de fréquence-somme Mémoire de DEA

Sartenaer, Yannick

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Etude d'un biocapteur modèle par
spectroscopie de génération de
fréquence-somme

Yannick SARTENAER

29 octobre 2004

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le professeur Paul Thiry, directeur du Laboratoire d'Analyse par Spectroscopie Moléculaire de Surface, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire mais surtout pour m'avoir accordé sa confiance en acceptant de promouvoir ce travail de recherche. Malgré un agenda surchargé, il a toujours trouvé du temps à me consacrer pour me prodiguer ses conseils judicieux.

Je tiens également à remercier le docteur Laurent Dreesen pour le temps et l'énergie qu'il m'a consacrés. Toutes les manipulations présentées ayant été réalisées avec lui, j'espère qu'il ne m'en voudra pas de lui voler la vedette au long de ces quelques pages. Merci d'avoir su guider mes premiers pas dans le monde merveilleux de la « Sfug ».

Merci aussi à tous les autres membres du laboratoire qui font de ce dernier un endroit où il fait bon vivre. Dans le désordre, merci à Christophe (Chum), Cédric, Aladin, André, Laurent Tchik, Yves, Christophe (Xi), Priscilla, Jacques, Chantal pour leurs conseils ou simplement leur bonne humeur.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à ma famille bien sûr et en particulier à mes parents (je sais ce que je leur dois) mais aussi à mon entourage en général pour leur soutien permanent. Merci particulier à Marjorie pour avoir supporté mes longues soirées de rédaction, à Christophe, Damien, Jérémy et Nicolas pour leur amitié, à tous les autres que j'oublie mais qui ont pu un jour me soutenir.

Merci aussi à mes deux correctrices (désormais attitrées) pour avoir relu ma prose sans pour autant en comprendre un seul mot. Elles sont le dernier rempart entre le lecteur et mon orthographe déplorable.

Table des matières

Introduction générale	4
1 L'optique non linéaire	6
1.1 Introduction	6
1.2 Polarisation linéaire des matériaux	7
1.3 Polarisation des matériaux en optique non linéaire	9
1.3.1 Susceptibilité du second ordre $\chi^{(2)}$	9
1.3.2 Propriétés de symétrie du tenseur $\chi^{(2)}$	10
1.3.3 Phénomènes optiques non linéaires du second ordre	11
1.4 Origine de la non linéarité	15
2 Spectroscopies optiques non linéaires	17
2.1 Introduction	17
2.2 Propagation des ondes électromagnétiques à l'interface	18
2.2.1 Equation de propagation appliquée à la SFG	21
2.2.2 Intensité du faisceau SFG réfléchi	22
2.2.3 Direction du faisceau SFG réfléchi	23
2.3 Modélisation des interfaces en spectroscopie SFG	25
3 Dispositif expérimental	28
3.1 Introduction	28
3.2 Le dispositif laser	28
3.2.1 L'oscillateur	29
3.2.2 L'amplificateur	32
3.2.3 L'OPO infrarouge	33
3.2.4 L'OPO visible	34
3.3 Configurations expérimentales	34
3.4 Chaîne de détection	36
4 Un biocapteur modèle : le système biotine-avidine	39
4.1 Introduction	39

4.2	Mais qu'est-ce qu'un biocapteur ?	40
4.3	Le complexe biotine-avidine	42
4.3.1	La biotine	42
4.3.2	La biocytine	44
4.3.3	L'avidine	45
5	Résultats expérimentaux	47
5.1	Introduction	47
5.2	Importance du substrat	48
5.2.1	Substrats métalliques	48
5.2.2	Substrats isolants	51
5.3	Préparation des échantillons	51
5.4	Spectres SFG sur substrats métalliques	52
5.4.1	La monocouche de biocytine	52
5.4.2	Interaction avec l'avidine	55
5.5	Spectres SFG sur CaF_2	56
5.5.1	La monocouche de biocytine	56
5.5.2	Interaction avec l'avidine	57
5.6	Sélectivité du capteur	59
5.7	Comparaison avec les spectres FT-IRRAS	61
5.8	Le point sur les différentes techniques de détection	64
	Conclusions et perspectives	66
	Bibliographie	68
	Table des figures	71

Introduction générale

Physicos est le mot grec pour désigner ce qui est naturel. Par extension, la physique est la science qui étudie la nature, qui s'intéresse aux phénomènes naturels. Si cette définition convient bien pour expliquer les préoccupations des philosophes grecs, elle est cependant tellement vague qu'elle pourrait s'appliquer de nos jours aussi à la chimie ou à la biologie.

Malgré cela, force est de constater que la physique en tant que telle tend à se rapprocher à nouveau de cette définition. En effet, l'analyse du point de vue physique de problèmes chimiques ou biologiques est un sujet de plus en plus prisé par les scientifiques. Ainsi, alors que ces trois sciences étaient bien cloisonnées il n'y a pas si longtemps, nous assistons à l'émergence de disciplines telles que la chimie-physique ou la bio-physique. Ces dernières s'évertuent à étudier des systèmes pour lesquels ces trois sciences présentent un intérêt.

C'est le cas des interfaces entre deux matériaux. En effet, elles sont le siège privilégié des interactions entre deux milieux. En physique, l'asymétrie des forces exercées à la surface va créer une organisation à deux dimensions qui modifie localement les caractéristiques du matériau. En chimie, ses propriétés particulières vont permettre l'exaltation de réactions. Alors qu'en biologie, les phénomènes de reconnaissance ou d'échange entre deux espèces biologiques passent également par l'interface qui existe entre elles. L'étude des surfaces est donc primordiale pour comprendre et exploiter les avantages qu'elles présentent dans chaque discipline.

Malheureusement, les interfaces sont des objets difficiles à caractériser étant donné le rapport de quantité de matière qu'il existe entre le volume et la surface. Malgré cela, l'optique non linéaire se révèle déterminante puisqu'elle permet de s'affranchir presque totalement de certaines contraintes imposées par d'autres techniques. En effet, les techniques optiques du second ordre ne sont pas sensibles à une éventuelle réponse de volume dans le cas d'un matériau centrosymétrique. De plus, le tenseur de susceptibilité observé par ces techniques et caractérisant la réponse de la matière, recèle quantité d'informations sur la structure spatiale, électronique et vibrationnelle.

Dans ce mémoire, nous avons entrepris d'appliquer ce type de techniques relevant de la physique moderne, à des interfaces complexes, utilisées en biologie, à savoir les biocapteurs. Afin de réaliser nos premiers pas dans cette curieuse association, nous avons choisi comme système de départ le complexe biotine-avidine qui est l'exemple le plus simple de capteur biologique.

La première partie de ce travail pose naturellement les bases de l'optique non linéaire. Nous y discutons ses origines mais aussi les grandeurs physiques que nous voulons observer et les différents phénomènes optiques du second ordre. Nous présentons alors de manière qualitative les origines réelles de la non linéarité optique.

Par la suite, dans le second chapitre, nous nous attachons à développer les techniques spectroscopiques qui découlent des phénomènes d'ordre deux en général et de la génération de fréquence-somme (SFG) en particulier. Nous établissons ainsi le formalisme nécessaire à la détermination de l'onde SFG produite par l'interface. Une dernière section est alors consacrée à la modélisation d'un adsorbat organique déposé à la surface d'un matériau.

Une fois les bases théoriques explicitées, l'aspect expérimental de ce mémoire est ensuite détaillé dans le chapitre trois. Nous y trouvons un descriptif complet du dispositif laser utilisé pour générer les effets non linéaires mais aussi de la mise en œuvre pratique de la spectroscopie par génération de fréquence-somme. Dans cette section sont expliqués tous les éléments se situant entre l'échantillon utilisé et l'expérimentateur.

Dans le chapitre quatre, nous expliquons ce qu'est, à notre sens, un biocapteur avant d'en discuter le fonctionnement et l'utilité. Nous décrivons alors le système biotine-avidine que nous avons étudié et présentons les molécules utilisées en pratique dans nos expériences.

Nous pouvons alors passer au cinquième chapitre, qui rend compte du travail de recherche effectué. Dans un premier temps, nous mentionnons certains aspects pratiques relatifs aux expériences, comme l'importance du substrat ou la préparation des solutions utilisées pour confectionner les échantillons. Dans un second temps, nous présentons les spectres SFG réalisés dans différentes conditions. Ces derniers sont ensuite discutés et interprétés afin de pouvoir en extraire l'information recherchée. Nous la comparons alors à celle obtenue à partir d'autres techniques.

Pour terminer, nous exposons nos conclusions dans le dernier chapitre et nous évoquons les perspectives relatives à ce mémoire.

Chapitre 1

L'optique non linéaire

1.1 Introduction

Comme nous le verrons plus loin, l'histoire de l'optique non linéaire est intimement liée à celle du laser. Bien qu'il existe, depuis des millénaires, des lasers CO_2 émettant autour de $10\text{ }\mu m$ dans l'atmosphère de Mars ou de Vénus [1], il a fallu attendre le début de ce siècle pour que cette technologie soit à portée de l'homme.

L'histoire du laser a débuté avec Albert Einstein qui, en 1917, présenta la théorie de l'émission stimulée selon laquelle un matériau pouvait émettre de la lumière s'il était correctement excité. Les bases théoriques du fonctionnement du laser étaient alors jetées, mais de nombreux chercheurs pensèrent qu'il était techniquement impossible de construire un dispositif produisant de la lumière par émission stimulée. L'histoire du laser nous démontre à quel point les préjugés des scientifiques peuvent entraver les progrès technologiques. Il a fallu attendre près de 35 ans après la publication de la théorie d'Einstein pour que des scientifiques s'intéressent de nouveau au phénomène de l'émission stimulée.

En 1953 Charles Townes fabriqua le premier maser, en collaboration avec certains de ses étudiants. Ce maser utilisait de l'ammoniac et produisait un rayonnement monochromatique à une longueur d'onde de 1,25 cm. Au cours des années qui suivirent, de nombreux autres masers furent fabriqués. Tous fonctionnaient dans le domaine des micro-ondes, le pas vers le domaine de la lumière visible et de ses courtes longueurs d'onde semblant infranchissable. Les expérimentateurs de l'époque entrevoyaient déjà les possibilités d'un maser optique, mais concevaient difficilement comment le construire.

En 1957, Townes commença à considérer les problèmes liés à la fabrication d'un dispositif semblable au maser, mais émettant du rayonnement infra-

rouge ou de la lumière visible. En collaboration avec Arthur Schawlow, il publia les premières propositions détaillées de masers optiques. Ils considérèrent alors l'utilisation d'une cavité résonante pour amplifier la lumière. En 1960, ils obtinrent le premier brevet de laser, mais celui-ci ne fut construit que plus tard. Le premier laser fonctionnel fut fabriqué par Theodore Maiman en 1960 [2]. Il découvrit que les ions de chrome d'un rubis artificiel émettaient de la lumière rouge lorsqu'ils étaient irradiés par la lumière verte d'une lampe au xénon. En déposant une couche d'aluminium à chaque extrémité de la tige de rubis, Maiman réussit à produire le premier laser optique. L'année suivante, le laser à hélium-néon, l'un des plus couramment utilisés aujourd'hui, fut inventé.

Grâce à cette nouvelle technologie permettant, entre autres choses, de générer un champ électrique suffisamment intense, le groupe de Franken de l'Université de Michigan met en évidence dès 1961, un phénomène optique inédit en générant le second harmonique à 347 nm d'un laser pulsé à rubis d'une longueur d'onde de 694 nm à travers un cristal de quartz [3]. L'optique non linéaire était née.

1.2 Polarisation linéaire des matériaux

Comme chacun sait, la lumière est une onde électromagnétique et à ce titre, elle est composée d'un champ électrique et d'un champ magnétique de polarisation transverse. Illuminer la matière revient donc à la soumettre à un champ électrique extérieur. Dans le cadre de l'optique linéaire, nous allons nous intéresser au comportement d'un matériau auquel nous appliquons un champ électrique de faible intensité comme celui fourni par une source lumineuse classique.

Si nous considérons la matière à l'échelle atomique, nous pouvons modéliser un atome diélectrique comme un noyau positif ponctuel $(+Q)$ entouré d'une charge sphérique négative $(-Q)$ dont le centre coïncide avec le noyau. Si nous appliquons un champ électrique extérieur à un tel système, nous observons que les centroïdes de charges se déplacent et ne coïncident plus. L'équilibre est atteint quand le champ électrique induit entre les charges positives et négatives compense le champ extérieur (Fig 1.1).

Dès lors, l'atome polarisé devient un petit dipôle électrique de moment dipolaire \vec{p} qui peut s'exprimer de manière tout à fait générale en ne tenant compte que de l'action du champ électrique extérieur par l'expression vectorielle suivante :

$$\vec{p} = \varepsilon_0 \vec{\alpha} \vec{E} \quad (1.1)$$

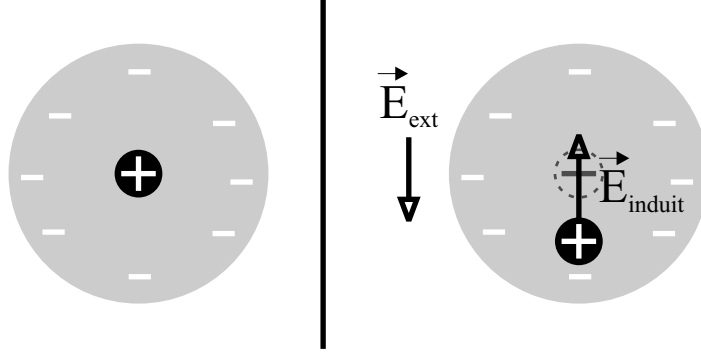


FIG. 1.1 – Atome diélectrique neutre (à gauche) et soumis à un champ électrique extérieur (à droite)

où ε_0 est la permittivité du vide ($8,86 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \text{J}^{-1} \text{m}^{-1}$) et $\vec{\alpha}$ est défini comme la *polarisabilité* électrique de l'atome [4]. Cette dernière est un tenseur de rang 2 car le moment dipolaire induit n'est pas forcément orienté dans la direction du champ électrique appliqué.

A ce stade, une précision s'impose. Tous les développements présentés dans le cadre de ce mémoire ne tiennent compte que des phénomènes physiques ayant lieu dans le cadre de l'*approximation dipolaire*. Tous les développements de la polarisation en termes multipolaires seront donc limités aux effets liés aux moments dipolaires électriques induits par le champ électrique extérieur. Nous ne tiendrons pas compte des effets liés aux moments dipolaires magnétiques, quadrupolaires électriques, etc... qui sont négligeables à notre niveau.

En généralisant tout ce qui précède à un système comprenant N atomes par unité de volume, nous pouvons exprimer \vec{P} , le moment dipolaire par unité de volume ou *polarisation* :

$$\vec{P} = N\vec{p} = N\varepsilon_0\vec{\alpha}\vec{E} = \varepsilon_0\vec{\chi}\vec{E} \quad (1.2)$$

où $\vec{\chi}$ est défini comme la *susceptibilité* électrique du matériau considéré. Tout comme la polarisabilité $\vec{\alpha}$, il s'agit également d'un tenseur de rang 2.

De là, nous pouvons définir des grandeurs comme la *constante diélectrique* $\vec{\varepsilon}_r$ et la *permittivité* $\vec{\varepsilon}$ de la manière suivante :

$$\vec{\varepsilon}_r = 1 + \vec{\chi} \quad (1.3)$$

$$\vec{\varepsilon} = \varepsilon_0\vec{\varepsilon}_r \quad (1.4)$$

Notons que nous pouvons relier ε_r à une grandeur physique mesurable : l'indice de réfraction n du matériau.

$$n(\omega) = \sqrt{\varepsilon_r(\omega)} \quad (1.5)$$

où ω est la pulsation du champ électrique généré par l'onde électromagnétique.

Sachant cela, nous pouvons exprimer le vecteur déplacement électrique \vec{D} pour un milieu diélectrique neutre soumis à un champ électrique \vec{E} . Il est défini comme le champ électrique total agissant dans le matériau ; à savoir la somme du champ électrique extérieur \vec{E} et de la polarisation \vec{P} :

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P} = \varepsilon_0 \vec{E} + \varepsilon_0 \vec{\chi} \vec{E} = \varepsilon_0 (1 + \vec{\chi}) \vec{E} = \varepsilon_0 \vec{\varepsilon}_r \vec{E} = \vec{\varepsilon} \vec{E} \quad (1.6)$$

Remarquons deux formes intéressantes de l'expression de \vec{D} :

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P} = \vec{\varepsilon} \vec{E} \quad (1.7)$$

Dans la première forme, \vec{D} est exprimé comme étant une contribution du vide $\varepsilon_0 \vec{E}$ et une contribution de la matière \vec{P} alors que la seconde est directement reliée au champ électrique en utilisant la permittivité. Notons également qu'il est nécessaire que $\vec{\varepsilon}$ soit un tenseur d'ordre deux puisque \vec{D} et \vec{E} ne sont pas toujours parallèles, comme dans le cas des milieux anisotropes.

1.3 Polarisation des matériaux en optique non linéaire

1.3.1 Susceptibilité du second ordre $\chi^{(2)}$

Nous allons maintenant nous intéresser au cas d'un matériau soumis à un champ électrique extérieur intense, comme celui fourni par un faisceau laser. Par intense, nous entendons un champ électrique dont l'intensité n'est plus négligeable par rapport au champ régnant au sein de l'atome. Afin de mieux s'en rendre compte, nous pouvons évaluer le champ électrique agissant sur un électron présent au sein de l'atome d'hydrogène dans le formalisme de Bohr (rayon de Bohr = $a_0 = 5,29 \cdot 10^{-11} m$) :

$$E = \frac{F}{e} \Rightarrow E = \frac{e}{4\pi\varepsilon_0 a_0^2} = \frac{9 \cdot 10^9 \times 1,6 \cdot 10^{-19}}{(5,3 \cdot 10^{-11})^2} = 5,1 \cdot 10^{11} \text{ V/m} \quad (1.8)$$

Si nous utilisons un faisceau laser de 600 mW focalisé sur une surface de $1 \mu m^2$, nous obtenons un champ électrique de l'ordre de 10^8 V/m ce qui n'est

plus négligeable par rapport à la valeur calculée pour l'atome d'hydrogène [5].

Dans ce cas, la relation 1.7 n'est plus valable car la polarisation contient des termes d'ordre supérieur en \vec{E} . En effet, comme la loi de Hooke pour le ressort $F = -kx$, celle-ci n'est rien d'autre que le premier terme d'un développement en série tronqué au premier ordre. Lorsque le champ électrique est très intense, nous ne pouvons plus négliger les termes d'ordre supérieur et nous avons :

$$\vec{D} = \vec{\epsilon}\vec{E} + \vec{P}_{NL} = \epsilon_0\vec{E} + \vec{P}_L + \vec{P}_{NL} = \epsilon_0\vec{E} + \vec{P} \quad (1.9)$$

Avec, cette fois, la polarisation totale valant :

$$\vec{P} = \vec{P}_L + \vec{P}_{NL} = \underbrace{\vec{P}^{(1)}(\vec{E})}_{\vec{P}_L} + \vec{P}^{(2)}(\vec{E}^2) + \vec{P}^{(3)}(\vec{E}^3) + \dots \quad (1.10)$$

ou encore :

$$\vec{P} = \epsilon_0\vec{\chi}^{(1)}\vec{E} + \epsilon_0\vec{\chi}^{(2)}\vec{E}^2 + \epsilon_0\vec{\chi}^{(3)}\vec{E}^3 + \dots \quad (1.11)$$

où $\chi^{(n)}$ est la *susceptibilité* d'ordre n , c'est-à-dire un tenseur de rang $(n+1)$ avec 3^{n+1} composantes.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes limités aux phénomènes d'optique non linéaire d'ordre deux, ce qui signifie que la grandeur physique qui nous intéresse particulièrement est la susceptibilité du second ordre $\vec{\chi}^{(2)}$. Il s'agit d'un tenseur de rang $(2+1) = 3$ comprenant 27 composantes.

1.3.2 Propriétés de symétrie du tenseur $\chi^{(2)}$

Comme nous nous en rendrons compte plus loin, une des propriétés la plus intéressante des spectroscopies optiques non linéaires du second ordre provient du fait qu'elles sont intrinsèquement sensibles aux interfaces. Ceci découle d'une propriété toute simple du tenseur de susceptibilité d'ordre deux.

En effet, supposons que nous soumettions un champ électrique \vec{E} à un matériau centrosymétrique, c'est-à-dire qui présente un centre d'inversion. Nous pouvons en écrire l'expression de la polarisation non linéaire en nous limitant, comme mentionné ci-dessus, au second ordre. Nous avons :

$$\vec{P}_{NL} = \epsilon_0\vec{\chi}^{(2)}\vec{E}^2 \quad (1.12)$$

Si nous soumettons maintenant ce même matériau à un autre champ électrique \vec{E}' de sens opposé au premier, tel que $\vec{E}' = -\vec{E}$, nous avons alors :

$$\vec{P}'_{NL} = \epsilon_0\vec{\chi}^{(2)}\vec{E}'^2 \quad (1.13)$$

Étant donné que le système présente un centre de symétrie, nous avons la condition suivante :

$$\vec{P}'_{NL} = -\vec{P}_{NL} \quad (1.14)$$

Et finalement, en combinant toutes ces expressions, nous obtenons :

$$\varepsilon_0 \vec{\chi}^{(2)} \vec{E}^2 = -\varepsilon_0 \vec{\chi}^{(2)} \vec{E}^2 \quad (1.15)$$

$$\vec{\chi}^{(2)} (-\vec{E})^2 = -\vec{\chi}^{(2)} \vec{E}^2 \quad (1.16)$$

$$\vec{\chi}^{(2)} = -\vec{\chi}^{(2)} \quad (1.17)$$

$$\vec{\chi}^{(2)} = \vec{0} \quad (1.18)$$

La seule solution est la solution triviale. Nous avons donc que, dans le cadre de l'approximation dipolaire, les matériaux centrosymétriques ne présentent pas de réponse non linéaire du second ordre. Une analyse plus détaillée des équations présentées ci-dessus nous montre que cette condition peut se généraliser aux susceptibilités d'ordre pair.

Nous pouvons maintenant expliquer cette fameuse sensibilité aux interfaces propre aux spectroscopies optiques non linéaires du second ordre. En effet, la plupart des matériaux usuels présentent un centre d'inversion et ne donnent donc pas de signal non linéaire *de volume*. Par contre, l'interface entre ces matériaux apparaît comme une rupture de symétrie générant une importante source de polarisation non linéaire *de surface*. Le signal recueilli avec ce type de technique est donc directement issu de l'interface sans contribution provenant du volume du matériau lui-même.

En ce qui concerne les matériaux non centrosymétriques, beaucoup moins nombreux, ils sont également appelés *cristaux non linéaires* et sont les seuls à pouvoir générer en volume des effets non linéaires du second ordre. Comme nous le verrons plus loin dans la description du dispositif expérimental, ces derniers peuvent servir pour des applications particulières parfois bien utiles.

1.3.3 Phénomènes optiques non linéaires du second ordre

Envisageons à présent une onde électromagnétique se propageant selon OX et polarisée perpendiculairement dans la direction OZ . Dans le cadre des approximations explicitées ci-dessus, nous ne tenons compte que du champ électrique oscillant de celle-ci. L'équation de l'onde peut s'écrire [6] :

$$E_z(t) = E_{0Z} \cos \left(\frac{2\pi x}{\lambda} - \omega t \right) \quad (1.19)$$

Dans l'argument du cosinus, nous pouvons négliger la partie spatiale de la phase $\frac{2\pi x}{\lambda}$. En effet, cette dernière reste très faible en regard de la partie temporelle pour les longueurs d'onde optiques que nous considérons et les dimensions typiques des atomes ($\sim 10^{-3}$ car $x \sim 10^{-10}$ et $\lambda \sim 10^{-6}$). Nous obtenons alors :

$$E_z(t) = E_{0Z} \cos(\omega t) \quad (1.20)$$

Notre but est d'évaluer les composantes de la polarisation à partir de l'expression ci-dessus en nous limitant aux susceptibilités du premier et second ordre. En injectant cette expression dans l'équation 1.11 selon OX , OY et OZ :

$$P_x = \varepsilon_0 \chi_{xz}^{(1)} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} E_{0Z}^2 \cos^2(\omega t) \quad (1.21)$$

$$P_y = \varepsilon_0 \chi_{yz}^{(1)} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi_{yzz}^{(2)} E_{0Z}^2 \cos^2(\omega t) \quad (1.22)$$

$$P_z = \varepsilon_0 \chi_{zz}^{(1)} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi_{zzz}^{(2)} E_{0Z}^2 \cos^2(\omega t) \quad (1.23)$$

En se souvenant de la formule trigonométrique de Carnot :

$$1 + \cos 2x = 2 \cos^2 x \quad (1.24)$$

Nous obtenons finalement pour la polarisation :

$$P_x = \varepsilon_0 \chi_{xz}^{(1)} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} \frac{E_{0Z}^2}{2} + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} \frac{E_{0Z}^2}{2} \cos(2\omega t) \quad (1.25)$$

$$P_y = \varepsilon_0 \chi_{yz}^{(1)} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi_{yzz}^{(2)} \frac{E_{0Z}^2}{2} + \varepsilon_0 \chi_{yzz}^{(2)} \frac{E_{0Z}^2}{2} \cos(2\omega t) \quad (1.26)$$

$$P_z = \varepsilon_0 \chi_{zz}^{(1)} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi_{zzz}^{(2)} \frac{E_{0Z}^2}{2} + \varepsilon_0 \chi_{zzz}^{(2)} \frac{E_{0Z}^2}{2} \cos(2\omega t) \quad (1.27)$$

Le premier terme du membre de droite est relatif à l'optique linéaire qui prédit une polarisation oscillant à la fréquence ω du champ électrique. Quant au terme non linéaire, il contient à présent une composante à fréquence nulle et une composante à la fréquence 2ω :

$$\vec{P} = \vec{P}_L(\omega) + \vec{P}_{NL}(0, 2\omega) \quad (1.28)$$

Ces deux phénomènes sont respectivement appelés *rectification optique* et *génération du second harmonique*. Le premier consiste en l'apparition d'une différence de potentiel aux bornes du matériau considéré tandis que le second double la fréquence du rayonnement incident et en change ainsi la couleur.

Considérons maintenant le cas de deux ondes électromagnétiques se propageant toutes deux selon OX et polarisées perpendiculairement dans la

même direction OZ mais possédant des fréquences différentes ω_1 et ω_2 . Nous obtenons après simplification de la partie spatiale de la phase :

$$E_1(t) = E_{1Z} \cos(\omega_1 t) \quad (1.29)$$

$$E_2(t) = E_{2Z} \cos(\omega_2 t) \quad (1.30)$$

Déterminons la composante de la polarisation selon OX en nous arrêtant au second ordre :

$$\begin{aligned} P_x &= P_{Lx} + P_{NLx} \\ &= \varepsilon_0 \chi_{xz}^{(1)} (E_1 + E_2) + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} (E_1 + E_2)^2 \\ &= \varepsilon_0 \chi_{xz}^{(1)} E_1 + \varepsilon_0 \chi_{xz}^{(1)} E_2 + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} E_1^2 + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} E_2^2 + 2\varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} E_1 E_2 \\ &= \left\{ \varepsilon_0 \chi_{xz}^{(1)} E_{1Z} \cos(\omega_1 t) + \varepsilon_0 \chi_{xz}^{(1)} E_{2Z} \cos(\omega_2 t) \right\} \\ &\quad + \left\{ \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} E_{1Z}^2 \cos^2(\omega_1 t) + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} E_{2Z}^2 \cos^2(\omega_2 t) \right. \\ &\quad \left. + 2\varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} E_{1Z} E_{2Z} \cos(\omega_1 t) \cos(\omega_2 t) \right\} \end{aligned} \quad (1.31)$$

Nous obtenons à nouveau une équation du type :

$$P = P_L + P_{NL} \quad (1.32)$$

Comme nous pouvions nous y attendre, la partie linéaire nous livre deux contributions à la polarisation qui oscillent aux fréquences ω_1 et ω_2 des champs incidents. En ce qui concerne le terme non linéaire, nous pouvons y appliquer les formules de trigonométrie suivantes :

$$2 \cos a \cos b = \cos(a + b) + \cos(a - b) \quad (1.33)$$

$$1 + \cos 2x = 2 \cos^2 x \quad (1.34)$$

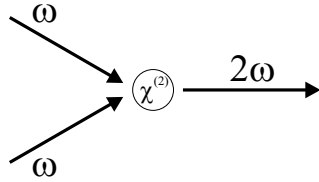
Nous obtenons alors :

$$\begin{aligned} P_{NLx} &= \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} \frac{E_{1z}^2}{2} + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} \frac{E_{2z}^2}{2} \\ &\quad + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} \frac{E_{1z}^2}{2} \cos(2\omega_1 t) + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} \frac{E_{2z}^2}{2} \cos(2\omega_2 t) \\ &\quad + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} E_{1z} E_{2z} \cos[(\omega_1 + \omega_2)t] \\ &\quad + \varepsilon_0 \chi_{xzz}^{(2)} E_{1z} E_{2z} \cos[(\omega_1 - \omega_2)t] \end{aligned} \quad (1.35)$$

La réponse en terme de polarisation de la susceptibilité du second ordre face à deux champs électriques extérieurs de fréquences ω_1 et ω_2 , contient donc quatre termes (Fig. 1.2) :

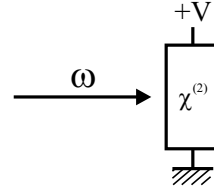
- Deux termes à fréquence nulle associés à la *rectification optique*.
- Un terme à la fréquence $2\omega_1$ et un terme à la fréquence $2\omega_2$ qui sont la *génération du second harmonique* pour chacune des fréquences excitatrices.
- Un terme à la fréquence $[\omega_1 + \omega_2]$ qui est la *génération de fréquence-somme* (SFG).
- Un terme à la fréquence $[\omega_1 - \omega_2]$ qui est la *génération de fréquence-différence* (DFG).

Génération du second harmonique



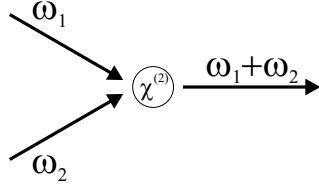
Absorption virtuelle de deux photons à la fréquence ω et émission d'un photon à la fréquence 2ω .

Rectification optique



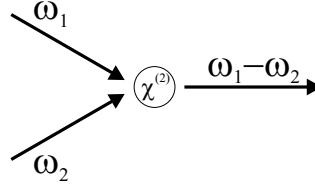
Génération d'une différence de potentiel aux bornes d'un milieu non linéaire sous l'action d'un champ électromagnétique intense.

Génération de fréquence-somme



Absorption virtuelle d'un photon à la fréquence ω_1 et d'un photon à la fréquence ω_2 et émission d'un photon à la fréquence $\omega_1 + \omega_2$.

Génération de fréquence-différence



Absorption virtuelle d'un photon à la fréquence ω_1 et d'un photon à la fréquence ω_2 et émission d'un photon à la fréquence $\omega_1 - \omega_2$.

FIG. 1.2 – *Les principaux phénomènes optiques du second ordre*

Comme nous pouvons nous en rendre compte, même en se limitant au second ordre, l'optique non linéaire permet de manipuler à volonté la fréquence de la lumière. Le chapitre suivant présente les principales spectroscopies optiques du second ordre qui relèvent des phénomènes physiques présentés ci-dessus.

1.4 Origine de la non linéarité

A ce stade de nos développements, il semble important de préciser les origines physiques de la non linéarité. L'objectif de ce paragraphe est de comprendre clairement d'où proviennent les phénomènes non linéaires en optique, c'est pourquoi celui-ci se veut qualitatif. Une description quantitative reprenant la résolution in-extenso des équations peut se trouver ailleurs [5].

En réalité, la non linéarité apparaît dans le modèle élémentaire de « l'électron élastiquement lié » utilisé pour prédire la réponse de celui-ci par rapport à un champ électrique excitateur. En effet, un matériau peut être essentiellement considéré comme un ensemble de particules chargées. Soumises à un champ électrique, les charges tendent à se déplacer. Dans le cas d'un conducteur, les électrons peuvent se déplacer à travers le matériau donnant lieu à un courant électrique. Dans le cas d'un diélectrique, qui est d'usage beaucoup plus courant en optique, les particules chargées sont fortement liées les unes aux autres. Les charges ont alors un mouvement transitoire et s'éloignent légèrement de leur position d'équilibre. Ce sont ces petits déplacements élémentaires qui se traduisent par l'apparition du moment dipolaire induit dont nous avons parlé précédemment. De plus, les ions positifs ayant souvent une masse considérablement supérieure à celle des électrons, il est possible de considérer en bonne approximation que seuls ces derniers sont animés d'un mouvement. Nous pouvons décrire une telle situation à l'aide d'un modèle simple où l'électron de masse m et de charge $-e$ est lié au noyau par l'intermédiaire d'un ressort. Nous considérons alors les atomes comme un ensemble d'oscillateurs harmoniques amortis, ayant une constante d'amortissement γ et une pulsation résonante $\omega_0 = \sqrt{k/m}$. En présence d'un champ électrique extérieur, l'équation du mouvement d'un électron s'écrit comme le prédit Newton :

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = -\gamma m \frac{dx}{dt} - kx - eE(t) \quad (1.36)$$

où nous reconnaissons dans le membre de droite, le terme d'amortissement, la force de rappel et la force excitatrice. En résolvant cette équation par l'utilisation de champs monochromatiques stationnaires de type $E_0 e^{-i\omega t}$, nous pouvons déduire l'expression du moment dipolaire de l'atome et, de là, sa polarisabilité. Ce qui nous amène finalement à l'expression de la susceptibilité et de la polarisation d'ordre un en multipliant par le nombre d'électrons par unité de volume. Dans un tel cas de figure, nous comprenons que cette polarisation ne peut qu'évoluer linéairement par rapport au champ électrique extérieur puisque l'amplitude d'oscillation des électrons est proportionnelle au champ.

En physique, la dépendance linéaire d'une quantité en fonction d'une autre est presque toujours une approximation, qui reste valable uniquement à l'intérieur d'un domaine particulier de l'espace des paramètres. Dans le cas présent, l'amplitude du mouvement des électrons au sein du matériau ne peut être considérée comme linéaire par rapport au champ électrique qu'à la limite où leur déplacement est petit. Pour des écarts à l'équilibre plus importants, la force de rappel devient significativement non linéaire en x de manière à contenir le mouvement des électrons au voisinage du noyau. Ceci arrive lorsque le champ électrique excitateur devient trop intense. Les électrons n'évoluent donc plus dans un potentiel harmonique et il faut introduire des termes supplémentaires dans l'expression de la force de rappel. Nous nous trouvons alors dans le cadre de l'oscillateur anharmonique amorti et l'équation précédente s'écrit alors, en nous limitant à l'ordre deux :

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = -\gamma m \frac{dx}{dt} - kx - \alpha x^2 - eE(t) \quad (1.37)$$

où $-\alpha x^2$ est le terme qui introduit le potentiel anharmonique. Lorsque les termes non harmoniques sont pris en compte, il n'existe plus de solution générale à notre équation. Toutefois, dans la limite où ces termes sont suffisamment petits devant la composante harmonique, il est possible de procéder à une résolution par perturbations en effectuant un développement de la solution x en puissance de l'amplitude du champ électrique. Ceci conduit à l'expression de la polarisation du milieu admettant également un développement en puissance de E , comme elle est présentée à l'équation 1.11 et qui fait apparaître la susceptibilité du second ordre. Comme nous l'avons vu précédemment, c'est cette dernière qui est responsable des phénomènes non linéaires dont il est question dans ce mémoire.

Comme nous pouvons le constater, la non linéarité n'est pas intrinsèque à un champ électrique trop intense comme cela est parfois mal compris. En réalité, elle trouve ses origines au cœur même de la réponse du matériau. C'est donc la matière au sens strict qui donne naissance aux phénomènes non linéaires présentés précédemment.

Notons pour terminer ce paragraphe que le modèle de l'oscillateur anharmonique présenté ici a ses limites. Par exemple, nous avons uniquement considéré le cas où la fréquence optique était proche du domaine visible, de sorte que le mouvement des électrons était la composante dominante de la réponse du milieu. Aux fréquences infrarouges, le mouvement des ions devient plus important et peut également jouer un rôle dans la réponse non linéaire du milieu.

Chapitre 2

Spectroscopies optiques non linéaires

2.1 Introduction

Après Franken en 1961 et la découverte expérimentale du deuxième phénomène optique du second ordre, la SFG, par Bass et al. en 1962 [7], quelques travaux mirent au point la spectroscopie SHG [8] mais il fallut attendre la fin des années 1980 pour assister au développement des spectroscopies optiques non linéaires.

En 1987, Y. Shen fut le premier à mettre en évidence la *spectroscopie par génération de fréquence-somme* sur des monocouches auto-assemblées [9][10]. En effet, de par leur nature non-linéaire de second ordre, les spectroscopies SHG, SFG et DFG sont des phénomènes fortement spécifiques aux surfaces et elles peuvent être utilisées pour caractériser tout type d'interface entre deux milieux centrosymétriques en volume qu'ils soient liquides, gazeux ou solides. Mais là où la spectroscopie de génération du second harmonique fournit des informations sur les propriétés électroniques ou l'anisotropie des matériaux, la SFG et la DFG, révèlent la signature vibrationnelle d'un adsorbat. Ces deux dernières apportent essentiellement la même information physique, cependant, la DFG reste moins aisée à mettre en œuvre expérimentalement ; c'est pourquoi la littérature est beaucoup plus riche en ce qui concerne la SFG.

Plus récemment, une nouvelle application de la spectroscopie SFG a été mise au point, la *SFG deux couleurs* ou *doublement résonante*. Celle-ci permet de mettre en évidence non seulement les propriétés vibrationnelles des interfaces étudiées mais également les propriétés électroniques.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons exclusivement utilisé la spectro-

scopie SFG simplement résonante. Dans les pages qui suivent, nous détaillons donc les fondements théoriques relatifs à la génération de fréquence-somme à l'interface entre deux milieux ainsi que la modélisation de cette même interface que nous procure cette spectroscopie. Les développements que nous présentons s'inspirent de différents ouvrages que nous ne saurions que trop conseiller au lecteur intéressé [11][12][13][14][15][16].

2.2 Propagation des ondes électromagnétiques à l'interface

Nous avons vu précédemment que nous pouvons évaluer la réponse d'un milieu à une excitation d'origine électromagnétique. Cette réponse, la polarisation, constitue une source qui, à son tour, va rayonner un champ électromagnétique. L'équation d'onde, qui régit la propagation de tous ces champs dans un milieu, peut être établie à partir des équations de Maxwell qui gouvernent tous les phénomènes électromagnétiques. Ces dernières s'écrivent dans le système MKS :

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (2.1)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} + \vec{J} \quad (2.2)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = \rho \quad (2.3)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (2.4)$$

avec $\vec{J}(r, t)$ et $\rho(r, t)$ étant respectivement les densités de courant et de charge et avec $\vec{E}(r, t)$ le champ électrique, $\vec{D}(r, t)$ le déplacement électrique, $\vec{B}(r, t)$ le champ d'induction magnétique et $\vec{H}(r, t)$ le champ magnétique. Ces grandeurs sont reliées entre elles par les relations suivantes :

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{\varepsilon} \vec{E} \quad (2.5)$$

$$\vec{B} = \mu_0 \vec{\mu} \vec{H} \quad (2.6)$$

où ε_0 et μ_0 sont respectivement la permittivité et la perméabilité magnétique du vide. Celles-ci sont des grandeurs scalaires, par opposition à $\vec{\varepsilon}$ et $\vec{\mu}$, la permittivité et la perméabilité magnétique du milieu, qui sont des grandeurs tensorielles dépendantes de la fréquence des champs excitateurs.

Pour simplifier, nous faisons l'hypothèse d'un milieu non magnétique pour lequel $\mu = 1$ et dépourvu de densité de courant et de charges. Nous avons

alors :

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (2.7)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{B} = \mu_0 \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (2.8)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = 0 \quad (2.9)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (2.10)$$

En prenant le rotationnel de l'équation 2.7, nous avons :

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) = \vec{\nabla} \times \left(-\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right) = -\frac{\partial (\vec{\nabla} \times \vec{B})}{\partial t} \quad (2.11)$$

En y injectant l'équation 2.8 :

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) = -\mu_0 \frac{\partial^2 \vec{D}}{\partial t^2} \quad (2.12)$$

D'autre part, la relation de constitution, précédemment définie, est :

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \quad (2.13)$$

Nous obtenons alors :

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) + \varepsilon_0 \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = -\mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2} \quad (2.14)$$

Sachant que :

$$\varepsilon_0 \mu_0 = \frac{1}{c^2} \quad (2.15)$$

Nous avons finalement :

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) + \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = -\frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2} \quad (2.16)$$

qui est l'équation de propagation pour le champ électrique. En examinant cette équation, nous remarquons que le membre de droite est relatif à la réponse du milieu par rapport au champ électrique. En prenant ce second membre nul, nous retombons bien sur l'équation d'Helmholtz qui prédit l'existence d'ondes électromagnétiques dans le vide à savoir un milieu de réponse nulle. Comme pour l'équation d'Helmholtz, nous pouvons résoudre

cette équation différentielle en supposant que le champ électrique prend la forme d'une superposition d'ondes planes monochromatiques :

$$\vec{E} = \sum_{i=1}^N \vec{E}_i e^{i(\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega_i t)} \quad (2.17)$$

où la somme s'étend non seulement aux ondes incidentes mais également à l'ensemble des ondes générées dans le milieu par la polarisation.

Comme nous l'avons vu précédemment, la polarisation induite dans le milieu contient une partie linéaire et une partie non linéaire :

$$\vec{P} = \vec{P}_L + \vec{P}_{NL} \quad (2.18)$$

Comme le champ électrique, cette polarisation peut se représenter comme une somme d'ondes planes monochromatiques :

$$\vec{P}_L(\vec{r}, t) = \sum_{i=1}^N \vec{P}_i^{(1)} e^{i(\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega_i t)} = \varepsilon_0 \sum_{i=1}^N \vec{\chi}^{(1)}(\omega_i) \vec{E}_i e^{i(\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega_i t)} \quad (2.19)$$

$$\vec{P}_{NL}(\vec{r}, t) = \sum_{n>1} \vec{P}^{(n)}(\vec{r}, t) = \sum_{i=1}^N \vec{P}_i^{NL} e^{i(\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega_i t)} \quad (2.20)$$

Sachant cela, l'équation de propagation du champ devient :

$$\sum_{i=1}^N \left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}_i) - \frac{\omega_i^2}{c^2} \vec{E}_i - \frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \omega_i^2 \vec{P}_i^{(1)} - \frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \omega_i^2 \vec{P}_i^{NL} \right] = 0 \quad (2.21)$$

Et donc :

$$\sum_{i=1}^N \left\{ \vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}_i) - \frac{\omega_i^2}{c^2} [1 + \vec{\chi}^{(1)}(\omega_i)] \vec{E}_i - \frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \omega_i^2 \vec{P}_i^{NL} \right\} = 0 \quad (2.22)$$

Cette équation doit être valable $\forall t$ et donc chacun des termes de la somme doit être nul quel que soit ω . Nous avons donc, en nous rappelant de la définition de μ_0 (2.15) et de $\vec{\varepsilon}_r$ (1.3), une équation pour chaque fréquence présente dans le milieu :

$$\left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times) - \frac{\omega^2}{c^2} \vec{\varepsilon}_r(\omega) \right] \vec{E}(\vec{k}, \omega) = \mu_0 \omega^2 \vec{P}_{NL}(\vec{k}, \omega) \quad (2.23)$$

2.2.1 Equation de propagation appliquée à la SFG

Examinons maintenant le cas de la génération de fréquence-somme et appliquons-lui l'équation de propagation que nous venons d'établir. Pour ce faire, considérons l'interface entre deux milieux semi-infinis ayant pour limite $y = 0$. Le premier, d'indice n_1 est un milieu linéaire et le second, d'indice n_2 , un milieu non linéaire. Considérons également deux ondes planes électromagnétiques incidentes, monochromatiques et coplanaires focalisées toutes deux en un point précis de l'interface. Le problème est de caractériser les champs électriques générés à la fréquence-somme, tant pour les ondes transmises (k_1^T, k_2^T, k_3^T) que réfléchies (k_3^R), tout cela en partant des ondes incidentes connues (k_1^I, k_2^I), (Fig. 2.1).

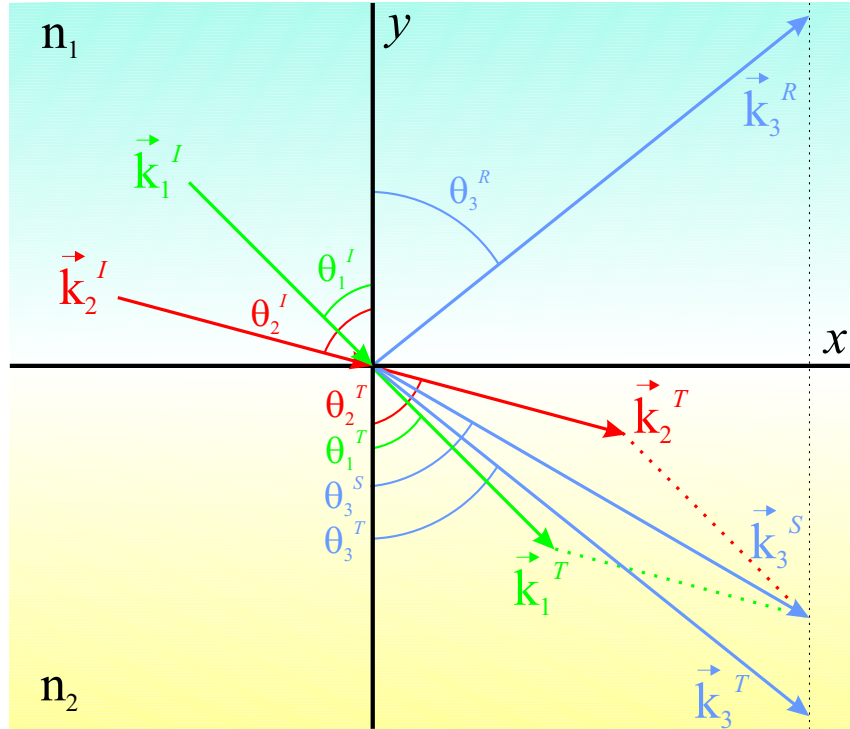


FIG. 2.1 – Différents vecteurs d'onde impliqués dans la génération de fréquence-somme dans un milieu non linéaire semi-infini de limite $y = 0$

Il y a donc trois ondes de fréquences différentes qui parcourent le milieu : ω_1 , ω_2 et $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$ et chacune doit vérifier l'équation 2.23. Nous obtenons alors trois équations couplées par l'intermédiaire de la polarisation non linéaire. La différence par rapport au cas linéaire vient du fait que ce

couplage peut mener à des échanges d'énergie entre ces trois ondes.

$$\left\{ \begin{array}{l} \left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times) - \frac{\omega_1^2}{c^2} \vec{\varepsilon}_r(\omega_1) \right] \vec{E}_1(\vec{k}_1, \omega_1) = \mu_0 \omega_1^2 \vec{P}^{(2)}(\vec{k}_1, \omega_1) \\ \left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times) - \frac{\omega_2^2}{c^2} \vec{\varepsilon}_r(\omega_2) \right] \vec{E}_2(\vec{k}_2, \omega_2) = \mu_0 \omega_2^2 \vec{P}^{(2)}(\vec{k}_2, \omega_2) \\ \left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times) - \frac{\omega_3^2}{c^2} \vec{\varepsilon}_r(\omega_3) \right] \vec{E}_3(\vec{k}_3, \omega_3) = \mu_0 \omega_3^2 \vec{P}^{(2)}(\vec{k}_3, \omega_3) \end{array} \right. \quad (2.24)$$

2.2.2 Intensité du faisceau SFG réfléchi

La résolution de ce système n'est pas chose aisée et nécessite d'utiliser des approximations. En effet, ce système peut s'écrire de manière équivalente en nous souvenant de l'expression de la polarisation d'ordre deux établie à l'équation 1.11 :

$$\left\{ \begin{array}{l} \left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times) - \frac{\omega_1^2}{c^2} \vec{\varepsilon}_r(\omega_1) \right] \vec{E}_1(\vec{k}_1, \omega_1) = \mu_0 \varepsilon_0 \omega_1^2 \vec{\chi}^{(2)}(-\omega_1, -\omega_2, \omega_3) \vec{E}_2^* \vec{E}_3 \\ \left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times) - \frac{\omega_2^2}{c^2} \vec{\varepsilon}_r(\omega_2) \right] \vec{E}_2(\vec{k}_2, \omega_2) = \mu_0 \varepsilon_0 \omega_2^2 \vec{\chi}^{(2)}(-\omega_2, -\omega_1, \omega_3) \vec{E}_1^* \vec{E}_3 \\ \left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times) - \frac{\omega_3^2}{c^2} \vec{\varepsilon}_r(\omega_3) \right] \vec{E}_3(\vec{k}_3, \omega_3) = \mu_0 \varepsilon_0 \omega_3^2 \vec{\chi}^{(2)}(-\omega_3, \omega_1, \omega_2) \vec{E}_1 \vec{E}_2 \end{array} \right. \quad (2.25)$$

Sous cette formulation, nous pouvons facilement nous rendre compte que la troisième équation est la seule que nous avons à considérer. En effet, l'intensité du faisceau SFG est négligeable par rapport à l'intensité des faisceaux incidents. Or, ces deux derniers n'interviennent ensemble que dans la dernière équation, associée à l'onde de fréquence ω_3 . Nous négligeons donc les polarisations non linéaires générées par chacune des ondes incidentes avec le faisceau SFG.

Il nous reste donc à résoudre l'équation :

$$\left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times) - \frac{\omega_3^2}{c^2} \vec{\varepsilon}_r(\omega_3) \right] \vec{E}_3(\vec{k}_3, \omega_3) = \mu_0 \omega_3^2 \vec{P}^{(2)}(\vec{k}_3, \omega_3) \quad (2.26)$$

Une solution particulière de cette équation différentielle inhomogène est l'onde plane de vecteur d'onde k_3^S et de fréquence ω_3 . Ceci nous permet d'explicitier quelque peu la figure 2.1. En effet, les ondes incidentes (I) sont, étant donné qu'elles respectent les lois de la réflexion et de la réfraction, en partie réfléchies et en partie transmises (T). De ces dernières est alors générée la polarisation non linéaire de vecteur d'onde k_3^S qui donne lieu aux ondes oscillants à la fréquence ω_3 . Nous obtenons alors deux ondes à la fréquence-somme, la première est transmise (T) et la seconde réfléchie (R). Notons que ces dernières sont des solutions de l'équation précédente rendue homogène.

Cette équation peut être solutionnée en nous souvenant que $\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times) = \vec{\nabla}(\vec{\nabla} \cdot) - \vec{\nabla}^2$ et en utilisant les propriétés relatives à l'utilisation de champs électriques sous forme d'ondes planes.

La résolution complète de cette équation nous amène à l'expression de \vec{E}_3 qui nous donne accès à l'intensité du faisceau SFG puisqu'en toute généralité nous avons :

$$I_{SFG} = \left| \vec{E}_3(\omega_3) \right|^2 \quad (2.27)$$

De cette expression du champ électrique, nous obtenons alors, sans entrer dans les détails, les contributions principales entrant en compte dans le calcul de l'intensité SFG. Il s'agit bien sûr, de la fréquence SFG et de la susceptibilité du second ordre mais aussi de ce que nous appellerons les facteurs de Fresnel. Ceux-ci définissent l'intensité du champ électrique total à l'interface engendré par un champ électrique incident et dépendent principalement des vecteurs d'onde associés à chaque champ électrique présent et de la constante diélectrique du milieu incident.

Nous obtenons finalement une expression complète de l'intensité du faisceau qui nous intéresse le plus, le faisceau SFG réfléchi. Cette expression tient compte, non seulement, des contributions mentionnées ci-dessus, mais également de l'intensité des faisceaux incidents, à savoir le visible et l'infrarouge :

$$I_{SFG}^R = \frac{\omega_{SFG}^2}{c^2} \left| \frac{F_{\omega_{SFG}}^R F(\omega_{IR}) F(\omega_{vis})}{2\sqrt{\varepsilon_3^R} \cos \theta_3^R} \right|^2 \left| \chi^{(2)}(-\omega_{SFG}, \omega_{IR}, \omega_{vis}) \right|^2 I(\omega_{IR}) I(\omega_{vis}) \quad (2.28)$$

Un élément remarquable de cette expression est, bien entendu, la dépendance en $\chi^{(2)}$ de cette expression. En effet, nous verrons par la suite que cette quantité se trouve grandement modifiée lorsque la fréquence du faisceau infrarouge correspond à une vibration du milieu considéré. Étant donné que les autres contributions varient peu avec la fréquence infrarouge, nous comprenons déjà que le fait de représenter l'intensité SFG en fonction de la longueur d'onde IR nous donnera une image de la susceptibilité du second ordre.

2.2.3 Direction du faisceau SFG réfléchi

Dans ce processus du second ordre, nous avons donc deux champs électriques incidents qui vont générer une polarisation non linéaire dans le milieu. Cette polarisation va rayonner un champ à la fréquence-somme. En toute généralité, ce rayonnement se fait de manière isotrope. Cependant, une direction peut être privilégiée : celle pour laquelle nous avons *accord de phase*,

qui s'exprime :

$$k_3^T = k_3^S \quad (2.29)$$

Cette relation découle de la *conservation de la quantité de mouvement* qui s'assortit également d'une autre équation qui est fondamentale dans toute la physique, à savoir la *conservation de l'énergie*.

$$\hbar \vec{k}_3^S = \hbar \vec{k}_1^T + \hbar \vec{k}_2^T \quad (2.30)$$

$$\hbar \omega_3 = \hbar \omega_1 + \hbar \omega_2 \quad (2.31)$$

Grâce à ces trois équations, en gardant à l'esprit les conditions de raccord à l'interface, nous pouvons aisément trouver la direction de propagation du faisceau SFG réfléchi.

En effet, la relation de conservation de la quantité de mouvement étant une relation vectorielle, elle est vraie également selon chacune de ses composantes scalaires, ce qui veut dire que les composantes des vecteurs d'onde parallèles à la surface (selon x) doivent être égales. Nous avons alors :

$$\hbar k_{3x}^S = \hbar k_{1x}^T + \hbar k_{2x}^T = \hbar k_{1x}^I + \hbar k_{2x}^I \quad (2.32)$$

En nous servant également de la condition d'accord de phase, nous pouvons écrire :

$$\hbar k_{3x}^T = \hbar k_{3x}^R = \hbar k_{1x}^T + \hbar k_{2x}^T = \hbar k_{1x}^I + \hbar k_{2x}^I \quad (2.33)$$

En écrivant les composantes selon x comme étant la norme du vecteur projetée sur l'axe, nous avons :

$$k_3^T \sin \theta_3^T = k_3^R \sin \theta_3^R = k_1^T \sin \theta_1^T + k_2^T \sin \theta_2^T = k_1^I \sin \theta_1^I + k_2^I \sin \theta_2^I \quad (2.34)$$

Nous obtenons alors :

$$\begin{aligned} \frac{\omega_3}{c} \sqrt{\varepsilon_3^T} \sin \theta_3^T &= \frac{\omega_3}{c} \sqrt{\varepsilon_3^R} \sin \theta_3^R \\ &= \frac{\omega_1}{c} \sqrt{\varepsilon_1^T} \sin \theta_1^T + \frac{\omega_2}{c} \sqrt{\varepsilon_2^T} \sin \theta_2^T \\ &= \frac{\omega_1}{c} \sqrt{\varepsilon_1^I} \sin \theta_1^I + \frac{\omega_2}{c} \sqrt{\varepsilon_2^I} \sin \theta_2^I \end{aligned} \quad (2.35)$$

où nous avons utilisé la relation de dispersion des ondes planes :

$$\frac{\omega^2}{c^2} = \frac{k^2}{n^2} = \frac{k^2}{\varepsilon} \Rightarrow k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon} \quad (2.36)$$

Après simplifications, nous obtenons un système de deux équations :

$$\omega_3 \sqrt{\varepsilon_3^R} \sin \theta_3^R = \omega_1 \sqrt{\varepsilon_1^I} \sin \theta_1^I + \omega_2 \sqrt{\varepsilon_2^I} \sin \theta_2^I \quad (2.37)$$

$$\omega_3 \sqrt{\varepsilon_3^T} \sin \theta_3^T = \omega_3 \sqrt{\varepsilon_3^R} \sin \theta_3^R \quad (2.38)$$

La première peut encore se simplifier étant donné que les trois ondes considérées se propagent dans le même milieu non dispersif et nous obtenons alors pour nos deux équations :

$$\omega_3 \sin \theta_3^R = \omega_1 \sin \theta_1^I + \omega_2 \sin \theta_2^I \quad (2.39)$$

$$\omega_3 \sqrt{\varepsilon_3^T} \sin \theta_3^T = \omega_3 \sqrt{\varepsilon_3^R} \sin \theta_3^R \quad (2.40)$$

La première, couplée à l'équation de conservation de l'énergie, nous permet de déterminer facilement la direction de propagation du faisceau SFG réfléchi en se basant sur notre configuration expérimentale connue, à savoir les fréquences et les angles des faisceaux incidents. Quant à la seconde, elle n'est autre que la loi de la réfraction pour l'onde SFG.

2.3 Modélisation des interfaces en spectroscopie SFG

Dans cette section, nous allons développer plus en détail la modélisation théorique d'un adsorbat moléculaire déposé sur une surface en spectroscopie SFG. En effet, si nous en croyons l'équation 2.28, il nous suffit de montrer que la susceptibilité du second ordre de l'adsorbat rend compte de sa nature vibrationnelle pour confirmer que la SFG peut s'utiliser comme une spectroscopie au sens strict du terme.

Dans un premier temps, nous considérerons que la contribution du substrat à la réponse non linéaire globale est négligeable. Ceci n'est pas toujours le cas, en particulier lorsque nous utilisons des substrats métalliques comme nous en parlerons plus loin. Notons également que nous ne parlerons pas ici d'effets doublement résonnants qui mettent en jeu des transitions électroniques en plus des transitions vibrationnelles. Le lecteur intéressé peut en trouver une description complète ailleurs [16].

Avant de parler de susceptibilité, considérons tout d'abord la polarisabilité d'ordre deux $\alpha^{(2)}$. Selon la description de Shen [11], nous pouvons écrire :

$$\begin{aligned} \alpha_{ijk}^{(2)}(\omega_3) = \frac{Ne^3 \rho(0)}{\hbar^2} [& \alpha_{1ijk}^{(2)}(\omega_3) \\ & + \alpha_{2ijk}^{(2)}(\omega_3) \\ & + \alpha_{3ijk}^{(2)}(\omega_3) \\ & + \alpha_{4ijk}^{(2)}(\omega_3) \\ & + \alpha_{5ijk}^{(2)}(\omega_3) \\ & + \alpha_{6ijk}^{(2)}(\omega_3)] \end{aligned} \quad (2.41)$$

où ω_3 est la pulsation SFG, $\rho_{(0)}$, la population du niveau fondamental (0) de l'adsorbat, N , le nombre d'atomes par unité de volume et e , la charge de l'électron.

Si nous considérons maintenant que les molécules adsorbées sont caractérisées par différents niveaux réels m et n de demi-largeur à mi-hauteur Γ_{om} et Γ_{on} qui peuvent être excités à partir du niveau fondamental (0) par des pulsations ω_{om} et ω_{on} , nous pouvons développer les éléments constitutifs de la relation précédente :

$$\alpha_{1ijk}^{(2)}(\omega_3) = \sum_{nm} \frac{(r_i)_{om}(r_j)_{mn}(r_k)_{on}}{(\omega_3 - \omega_{mo} + i\Gamma_{mo})(\omega_2 - \omega_{no} + i\Gamma_{no})} \quad (2.42)$$

$$\alpha_{2ijk}^{(2)}(\omega_3) = \sum_{nm} \frac{(r_i)_{om}(r_k)_{mn}(r_j)_{on}}{(\omega_3 - \omega_{mo} + i\Gamma_{mo})(\omega_1 - \omega_{no} + i\Gamma_{no})} \quad (2.43)$$

$$\alpha_{3ijk}^{(2)}(\omega_3) = \sum_{nm} \frac{(r_k)_{om}(r_j)_{mn}(r_i)_{on}}{(\omega_3 + \omega_{mo} + i\Gamma_{mo})(\omega_2 + \omega_{no} + i\Gamma_{no})} \quad (2.44)$$

$$\alpha_{4ijk}^{(2)}(\omega_3) = \sum_{nm} \frac{(r_j)_{om}(r_k)_{mn}(r_i)_{on}}{(\omega_3 + \omega_{mo} + i\Gamma_{mo})(\omega_1 + \omega_{no} + i\Gamma_{no})} \quad (2.45)$$

$$\alpha_{5ijk}^{(2)}(\omega_3) = \sum_{nm} \frac{(r_j)_{om}(r_i)_{mn}(r_k)_{on}}{(\omega_1 - \omega_{mo} + i\Gamma_{mo})(\omega_2 + \omega_{no} + i\Gamma_{no})} \quad (2.46)$$

$$\alpha_{6ijk}^{(2)}(\omega_3) = \sum_{nm} \frac{(r_k)_{om}(r_i)_{mn}(r_j)_{on}}{(\omega_2 - \omega_{mo} + i\Gamma_{mo})(\omega_1 + \omega_{no} + i\Gamma_{no})} \quad (2.47)$$

$$(2.48)$$

où les $(r_i)_{om}$ sont les éléments de matrice de transition dipolaire projetés sur x , y ou z entre le niveau m et le fondamental (0) dans l'expression de l'Hamiltonien d'interaction d'une molécule avec un champ électromagnétique et ω_2 , la pulsation du faisceau infrarouge.

Si nous nous limitons maintenant à un seul niveau vibrationnel (e) excitable par le faisceau infrarouge, les résonances SFG apparaissent pour $\omega_2 = \omega_{mo}$ et $\omega_2 = \omega_{no}$. Dans ce cas, les termes (2.42) et (2.47) deviennent prépondérants et nous négligeons donc les autres. Nous retrouvons alors pour l'expression (2.41) :

$$\alpha_{ijk}^{(2)}(\omega_3) = \underbrace{\frac{(r_k)_{eo}Ne^3\rho_{(0)}}{\hbar^2(\omega_3 - \omega_{eo} + i\Gamma_{eo})}}_{\star} \sum_m \left[\underbrace{\frac{(r_i)_{om}(r_j)_{me}}{(\omega_3 - \omega_{mo} + i\Gamma_{mo})} + \frac{(r_i)_{em}(r_j)_{mo}}{(\omega_1 + \omega_{mo} + i\Gamma_{mo})}}_{\star\star} \right] \quad (2.49)$$

où le terme marqué \star correspond à un processus d'absorption infrarouge à un photon et le terme marqué $\star\star$ à un processus Raman Anti-Stokes à deux photons.

Nous pouvons tirer une conclusion importante de cette relation. En effet, les processus SFG ne sont actifs que si les molécules considérées présentent des sections efficaces Raman et infrarouge simultanément actives.

Une fois ceci établi, nous pouvons maintenant pousser notre raisonnement plus loin et passer de la polarisabilité, grandeur microscopique, à son équivalent macroscopique, la susceptibilité $\chi^{(2)}$. Pour ce faire, nous devons avoir recours à une transformation de coordonnées (notée T), moyennée sur l'orientation des molécules, nous permettant de passer du repère de la molécule isolée (indices ijk) au repère du laboratoire (indices lmn). De plus, pour obtenir la susceptibilité totale, nous devons multiplier la polarisabilité par la densité surfacique de molécules N_s en considérant que l'élargissement des raies SFG est homogène. Nous obtenons finalement :

$$\chi_{SFG(lmn)}^{(2)} = N_s \sum_{ijk} \langle T_{lmn}^{ijk} \rangle \alpha_{ijk}^{(2)} \quad (2.50)$$

Il s'agit de l'expression de la susceptibilité totale d'ordre deux de l'adsorbat qui, comme nous pouvons le constater, varie principalement avec la fréquence du faisceau infrarouge. Cette dernière est le paramètre physique qui recèle toute l'information apportée par les moments de transitions dipolaires et les polarisabilités Raman. Il est donc tout à fait justifié de présenter les spectres expérimentaux comme l'intensité SFG en fonction de la longueur d'onde infrarouge comme ce sera le cas dans la suite de ce mémoire. Sous cette présentation, nous obtenons alors des spectres *vibrationnels* de l'interface étudiée.

Chapitre 3

Dispositif expérimental

3.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, la spectroscopie SFG nécessite des faisceaux lasers intenses. Dans cette optique, le laboratoire LASMOS et plus particulièrement les docteurs A. A. Mani et A. Peremans, ont mis au point un laser de table pulsé « tout solide » dont les spécifications sont parfaitement adaptées au besoin de la spectroscopie optique non linéaire. Signalons que ce montage, tenant toutes ses promesses, a été récompensé par le *Prix Economique de la Province de Namur 1999* [17]. Grâce à ce dispositif, nous disposons de deux faisceaux lasers pulsés de puissance crête suffisamment intense. Le premier est un faisceau accordable dans le domaine de l'infrarouge sur un domaine spectral allant de 2,5 à 10 μm et le second, un faisceau visible également accordable de 410 à 750 nm .

Dans les pages qui suivent, nous nous proposons de décrire succinctement ce dispositif afin de comprendre les conditions et contraintes expérimentales que nécessite la spectroscopie SFG. Toutefois, une description plus approfondie d'un tel système peut se trouver ailleurs [18][19][20][21].

3.2 Le dispositif laser

En consultant le schéma de principe du dispositif laser (Fig. 3.1), nous pouvons tout de suite nous rendre compte qu'il est composé de quatre parties principales. Ces « étages » sont :

- L'oscillateur (I)
- L'amplificateur (II)
- L'oscillateur paramétrique optique (OPO) infrarouge (III)
- L'OPO visible (IV)

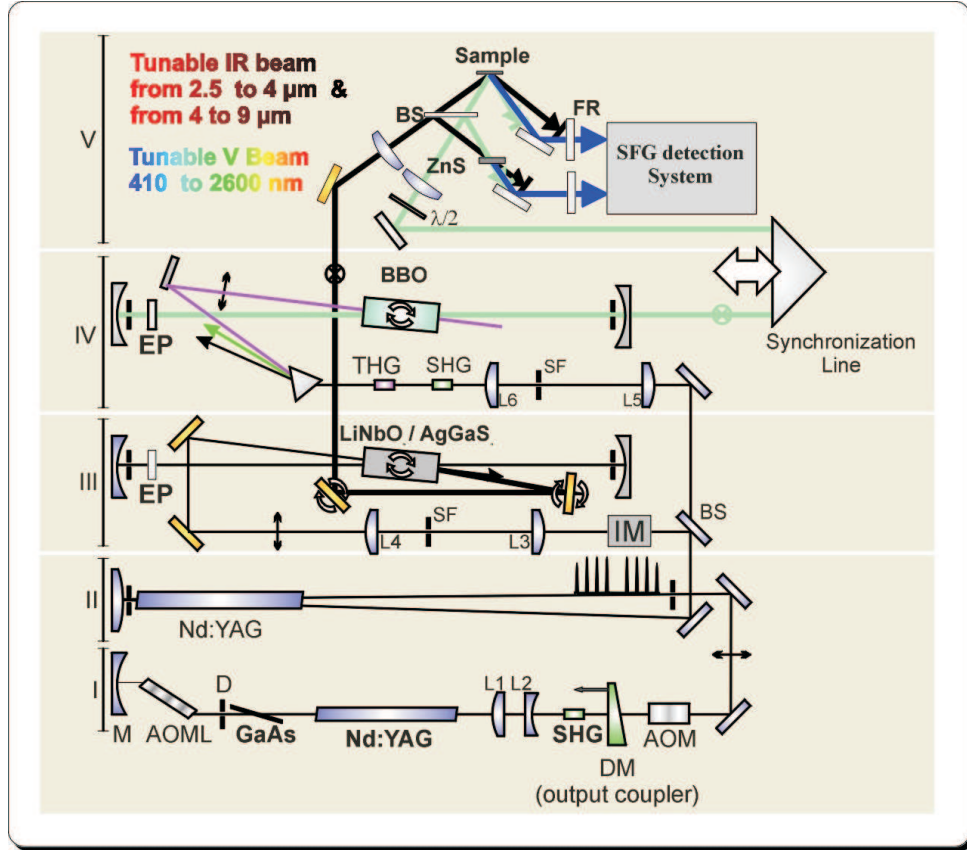


FIG. 3.1 – Dispositif laser développé au LASMOS et utilisé pour la spectroscopie SFG

3.2.1 L'oscillateur

La première partie est un laser Nd-YAG fonctionnant en mode bloqué. Comme nous le savons, tout laser est composé de trois parties essentielles, à savoir une cavité, un milieu actif et un dispositif de pompage. L'oscillateur reprend en réalité ces éléments constitutifs.

Le milieu actif est un barreau de Nd :YAG (Quantel) dont les faces sont clivées d'un angle de 2° afin d'éviter des oscillations parasites au sein même du milieu actif. Le Néodyme :Yttrium Aluminium Garnet est un grenat artificiel de composition $Y_3Al_5O_{12}$ dopé par des ions Néodyme. Environ 1% des ions Y^{3+} sont remplacés par des ions Nd^{3+} qui sont responsables de l'effet laser. Pour obtenir un tel effet, il faut réaliser une inversion de population du milieu optique. Réaliser cette inversion consiste à modifier l'occupa-

tion des niveaux énergétiques du milieu : il s'agit de vider l'un des niveaux énergétiques inférieurs au profit de l'un des niveaux supérieurs jusqu'à ce que la population de ce dernier soit supérieure à celle du premier. L'inversion une fois obtenue, le retour à l'équilibre se fera grâce à des transitions de relaxation radiatives qui, si elles s'effectuent avec émissions stimulées de photons, pourront donner lieu à une émission laser.

Le dépeuplement d'un niveau inférieur au profit d'un niveau supérieur peut être obtenu en soumettant le système à un rayonnement lumineux via des lampes à éclairs (taux de répétition de 25 Hz). Ces dernières sont disposées parallèlement au barreau et leur longueur d'onde est accordée à l'intervalle d'énergie séparant les deux niveaux considérés. Ce rayonnement induit alors des transitions du niveau fondamental vers un niveau supérieur dit de pompage. Un mécanisme qui ne met en oeuvre que deux niveaux n'est cependant pas suffisant ; en effet, dans un tel cas, les phénomènes de relaxation font qu'il n'est pas possible d'atteindre l'inversion de population. En d'autres termes, il est possible de déplacer l'équilibre, mais pas de se placer « hors équilibre » au sens de la statistique de Boltzmann. Pour obtenir l'inversion, il faut que le système se comporte de façon « dissymétrique » vis-à-vis des transitions grâce à la présence de niveaux intermédiaires servant de relais. Dans le cas du laser Nd-YAG, le milieu actif (les ions Nd^{3+} dispersés dans la matrice YAG) est un système qui met en jeu quatre niveaux (Fig. 3.2).

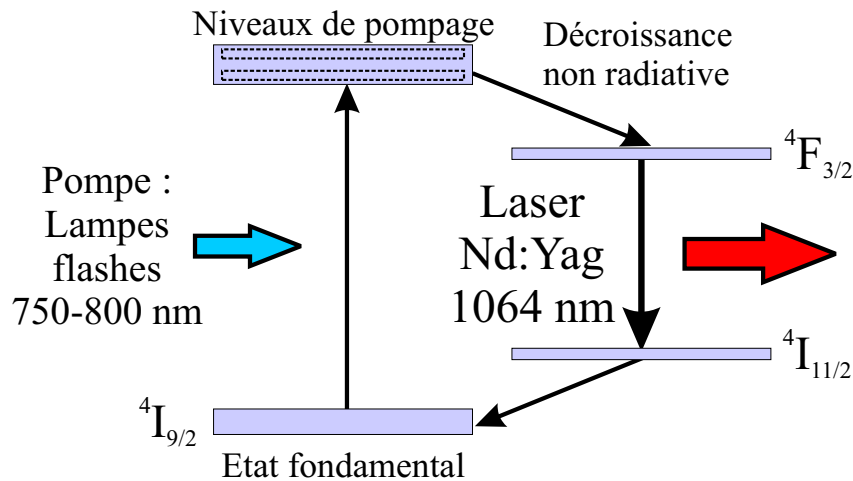


FIG. 3.2 – Schéma des niveaux d'énergie du Nd :YAG

Le pompage du système est obtenu grâce au rayonnement lumineux des lampes à éclairs qui induit des transitions du niveau fondamental $4I_{9/2}$ vers le niveau de pompage. En réalité, ce niveau n'est pas discret mais est constitué

de plusieurs bandes ; deux parmi les plus importantes peuvent être excitées à partir du niveau fondamental au moyen de longueurs d'onde voisines de 0.80 et 0.75 micromètres. Le pompage du Néodyme devra donc être effectué à partir d'une source dont le spectre recouvre ces bandes.

Les atomes excités présents au niveau de pompage relaxent très rapidement vers le niveau ${}^4F_{3/2}$ en cédant leur énergie au réseau cristallin. Cette décroissance transforme une partie de l'énergie de pompe en chaleur, ce qui nécessite un refroidissement des barreaux par circulation d'eau. Ce niveau présentant la particularité d'être métastable, les électrons excités viennent s'y accumuler, réalisant l'inversion de population entre les niveaux ${}^4I_{11/2}$ et ${}^4F_{3/2}$. Cette inversion est évidemment d'autant plus facile à obtenir que l'occupation du niveau ${}^4I_{11/2}$ est faible : en effet, ce dernier est suffisamment éloigné du niveau fondamental pour être pratiquement vide, et c'est de surcroît un niveau à courte durée de vie.

Le passage ${}^4F_{3/2}$ vers ${}^4I_{11/2}$ correspond à la transition laser, qui s'effectue par émission d'un photon à 1064 nm. Le barreau, associé aux lampes, constitue ainsi un amplificateur optique à cette longueur d'onde.

Afin d'obtenir en sortie du laser un faisceau dont les propriétés soient bien définies, il est indispensable d'ajouter à l'amplificateur une rétroaction sélective qui définira les caractéristiques spectrales, directionnelles et spatiales du rayonnement. C'est le rôle de la cavité (résonateur optique) constituée de deux miroirs qui se font face en encadrant le milieu actif. Un tel résonateur agit comme un filtre : seuls les photons dont la direction de propagation est parallèle à l'axe de la cavité résonante et dont la longueur d'onde est accordée à la distance séparant les deux miroirs, seront susceptibles d'osciller et, en conséquence, d'être amplifiés par émission stimulée à chacun de leurs passages dans le milieu actif. En d'autres termes, il existe un nombre déterminé de modes d'oscillation dans la cavité. Cependant, dans le cas du laser Nd-YAG, ces modes sont trop nombreux et nous avons donc recours à un modulateur acousto-optique (AOML) placé dans la cavité. Celui-ci est en fait un cristal piézo-électrique que nous faisons osciller en ajustant sa fréquence, il permet de limiter le nombre de modes possibles dans la cavité. Notons qu'un second modulateur (AOM), qui ne sert qu'à couper le début du train, se situe juste après la cavité.

Pratiquement, la cavité est constituée de deux miroirs adaptés à la longueur d'onde mise en jeu. Compte-tenu des fortes densités spatiales de puissance dans la cavité, ces miroirs sont de type diélectrique pour éviter l'absorption du rayonnement par la couche réfléchissante. Évidemment, il est nécessaire que l'un des miroirs soit partiellement transparent afin que le faisceau laser ainsi créé puisse s'échapper du résonateur.

Comme nous le verrons par après, le faisceau YAG devra parvenir à provoquer des effets non-linéaires dans certains cristaux. Pour ce faire, la puissance incidente doit être suffisamment élevée, ce qui peut être obtenu par compression des impulsions laser. La compression temporelle des impulsions consiste à empêcher momentanément l'émission laser, le temps d'accumuler par pompage optique une énergie maximale dans la cavité, afin de pouvoir ensuite la libérer "en bloc". Cette méthode permet d'augmenter la puissance crête de l'impulsion et de raccourcir sa durée (jusqu'à la dizaine de picosecondes par impulsion). La méthode utilisée ici est la technique dite du *miroir non linéaire* mise au point par Stankov [22]. Cette procédure est mise en place grâce à un cristal non linéaire (BBO) et un télescope (T) qui, couplés à un miroir dichroïque (DM) de sortie de cavité, permettent de diminuer la largeur temporelle des impulsions laser ainsi que de les stabiliser. Le dernier élément constitutif de la cavité est une lame d'AsGa utilisée comme mécanisme de contre-réaction passive, ce qui permet d'améliorer encore le rendement du miroir non linéaire.

Tout ce dispositif génère un faisceau composé de trains comprenant environ cent impulsions. Chaque train a une durée de l'ordre de la microseconde alors que les impulsions durent dans les 10 *ps*. La puissance moyenne délivrée à la sortie de l'oscillateur est d'une quinzaine de *mW*.

3.2.2 L'amplificateur

Afin d'obtenir une puissance suffisante pour alimenter les OPOs, le faisceau produit par l'oscillateur doit être amplifié. Cette procédure est réalisée en faisant effectuer au faisceau un double passage dans un autre barreau de Nd :YAG de diamètre plus grand et également pompé par lampes à éclairs à des temps bien choisis afin de renforcer celui-ci de photons supplémentaires. Cet étage amplificateur ne possède pas de cavité et ne peut donc pas être considéré comme un laser à proprement parler. La puissance de sortie de l'amplificateur à 1064 *nm* est de l'ordre du Watt, ce qui correspond, étant donné les caractéristiques de notre faisceau, à une énergie de 430 μJ par impulsion. En convertissant ceci en puissance, nous voyons aisément que cela suffit pour générer des effets non linéaires, condition indispensable au bon fonctionnement des oscillateurs paramétriques optiques.

Après cette étape, le faisceau pompe est envoyé dans une lame séparatrice 40/60 (BS) qui le sépare en deux parties. La première est envoyée afin de pomper l'OPO infrarouge et la seconde, après triplage de fréquence, vers l'OPO visible. Avant d'arriver à chacun des OPOs, le faisceau subit un filtrage spa-

tial grâce à une fine plaque de cuivre (SF) disposée au foyer d'une lentille. Une seconde lentille dont le foyer coïncide également avec cette plaquette récupère le faisceau, le rendant à nouveau parallèle. Les deux lentilles constituent alors un télescope. Ce filtrage permet d'ajuster le profil spatial de la pompe ce qui optimise la conversion de fréquence des étapes à venir.

3.2.3 L'OPO infrarouge

Les oscillateurs paramétriques optiques (OPO) permettent de générer de la lumière cohérente et accordable sur une grande plage de longueurs d'onde. Ces oscillateurs reposent sur le phénomène appelé amplification paramétrique qui est pratiquement l'inverse de la génération de fréquence-somme. Si on irradie un matériau non centrosymétrique avec un intense rayon lumineux d'une fréquence donnée, ce matériau non linéaire génère alors spontanément deux nouvelles fréquences dont la somme est la première.

Pratiquement, un cristal non linéaire de $LiNbO_3$ ou d' $AgGaS_2$ de susceptibilité non linéaire importante est placé dans une cavité laser entre deux miroirs en or. Il est irradié par le train d'impulsions du YAG. Lors de ce passage, un phénomène non linéaire peut prendre place sous certaines conditions d'accord de phase et deux faisceaux sont alors générés : l'*idler* à la fréquence ω_2 et le *signal* à la fréquence ω_3 tels que la somme de leur fréquence est égale à la fréquence du faisceau pompe $\omega_1 = \omega_2 + \omega_3$. Dans le cas de l'OPO infrarouge monté au LASMOS, c'est l'*idler*, accordable en fréquence, qui servira pour la spectroscopie SFG.

L'oscillation du faisceau signal dans la cavité optique est maintenue grâce à la technique du pompage synchrone. Celle-ci implique que le cristal soit pompé par un train d'impulsions brèves et que la période séparant les impulsions dans le train corresponde au temps de circulation d'un aller-retour d'une impulsion *signal* dans la cavité OPO. Ce faisceau est ainsi amplifié dans le cristal non linéaire par l'impulsion pompe suivante. Dans notre cas, le faisceau YAG génère un train d'impulsions de $1 \mu s$ comprenant une centaine d'impulsions séparées par $10 ns$. La condition de pompage synchrone est vérifiée lorsque la longueur optique de la cavité de l'OPO est ajustée à $1,5 m$.

La fréquence du faisceau signal est par conséquent la fréquence complémentaire du faisceau *idler*. Ces fréquences sont déterminées par les conditions d'accord de phase correspondant à la génération de fréquence différence dans le cristal. Dans un cristal isotrope, où l'indice de réfraction ne dépend pas de la direction de propagation des faisceaux, il n'est en général pas possible de trouver une solution à l'accord de phase. Par contre, ce dernier peut être

vérifié dans les cristaux biréfringents.

Une fois réalisé, le dispositif OPO doit être étalonné afin de déterminer la longueur d'onde du faisceau *idler* émise pour chaque position du cristal et afin d'obtenir, grâce à des miroirs pivotants, un faisceau dont la direction de propagation ne dépend plus de la position du cristal. L'OPO infrarouge permet un balaYAGe en fréquence du faisceau avec une puissance suffisante de 2,5 à 4 μm en utilisant le LiNbO_3 et de 4 à 9 μm en utilisant l' AgGaS_2 .

Notons également la présence d'une lame étalon (EP) placée au sein même de la cavité. Son rôle est d'améliorer la résolution spectrale du dispositif ($\sim 2\text{ cm}^{-1}$) en agissant comme un Fabry-Perot. En fonction de son orientation et de celle du cristal non linéaire dans la cavité, elle n'autorise à osciller dans la cavité dans les conditions du pompage synchrone que certaines fréquences du faisceau *signal*.

3.2.4 L'OPO visible

La dernière partie du dispositif est sensiblement semblable à la précédente à une petite différence près, celle-ci étant que le faisceau récupéré doit être un faisceau visible. Pour parvenir à cela, le faisceau pompe émis par le laser YAG doit d'abord passer dans deux cristaux non linéaires. Le premier, de type BBO va doubler la fréquence du faisceau par SHG de sorte que nous obtenions un faisceau vert de 532 nm . Le second de type LBO va, quant à lui, permettre le triplage de fréquence en faisant intervenir un phénomène de SFG de volume entre les deux faisceaux colinéaires en présence. Nous obtenons alors un faisceau ultraviolet à 355 nm qui va nous servir de pompe pour l'OPO visible.

Une fois ces trois fréquences différentes obtenues, elles sont séparées par un prisme et seul l'UV est conservé. Le dispositif reste le même que précédemment si ce n'est que nous collectons cette fois-ci le *signal* grâce à un miroir semi-transparent en fin de cavité. Nous obtenons finalement un faisceau visible accordable en fréquence permettant un balaYAGe de 410 à 750 nm . Il est à signaler que, puisque l'obtention du faisceau UV nécessite plus d'énergie, la lame séparatrice distribuant le faisceau YAG aux deux OPOs le fait dans des proportions différentes ($\sim 40/60\%$).

3.3 Configurations expérimentales

Dans la configuration « classique » utilisée en spectroscopie SFG (Fig. 3.3 (a)), les faisceaux visible et infrarouge sont focalisés en un point de

l'échantillon plan sur lequel a été déposé l'adsorbat. Afin d'obtenir un rendement optimal de génération de fréquence-somme, ces deux faisceaux doivent être synchronisés aussi bien spatialement que temporellement. Les angles d'incidence utilisés sont respectivement de 55° pour le faisceau visible et de 65° pour l'infrarouge. Ces derniers sont choisis car ils sont les plus favorables au niveau du calcul des facteurs de Fresnel qui interviennent dans la détermination du champ électrique à la fréquence-somme pour les métaux. Le signal SFG est alors recueilli en réflexion suivant un angle déterminé comme précédemment et traité comme nous le décrivons ci-dessous. Sauf mention contraire, tous les faisceaux sont polarisés p et la longueur d'onde visible utilisée est de 532 nm .

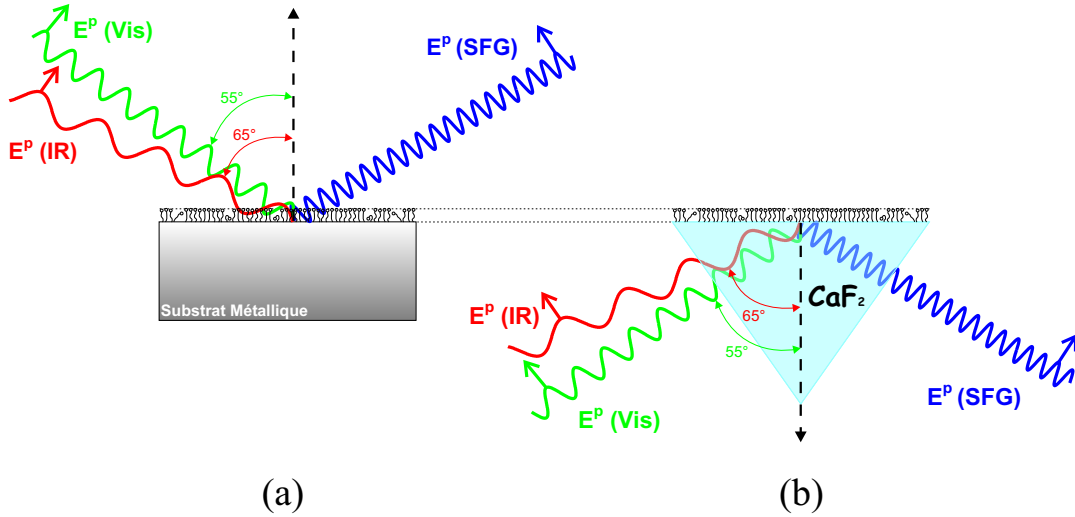


FIG. 3.3 – Différentes configurations expérimentales utilisées : (a) configuration classique (b) configuration en réflexion totale

Comme nous le verrons par la suite, nous avons utilisé différents types de substrats au cours de nos expériences. Bien que pour les substrats métalliques, nous ayons eu recours à la configuration classique utilisée en SFG, il en va autrement pour les substrats isolants. En effet, pour ces derniers, nous avons employé du CaF_2 qui présente l'avantage d'être transparent aussi bien dans le visible que dans l'infrarouge dans la gamme spectrale étudiée. Tirant parti de cet avantage, nous pouvons, non plus utiliser un échantillon plan, mais un prisme équilatéral. Le dépôt de molécules s'effectuant alors sur la base du prisme, les rayons incidents traversent le prisme et se réfléchissent sur la face analysée en conditions de réflexion totale. Par chance, nous n'avons pas

à changer les angles utilisés habituellement. En effet, un rapide calcul basé sur les lois de Snell montre que les faisceaux visible et infrarouge arrivent sur la base du prisme à des angles supérieurs aux angles limites.

Dans cette configuration dite de « réflexion totale » (TIR : total internal reflexion) (Fig. 3.3 (b)), l'interface est sondée par l'onde évanescente résultant du phénomène de réflexion totale. Nous pouvons rapidement nous rendre compte de manière intuitive que cette configuration est favorable à la génération de fréquence-somme. En effet, l'optique géométrique nous apprend que plus nous nous rapprochons de l'angle limite, plus l'angle de réfraction tend vers 90° . Une fois l'angle limite atteint, les rayons réfractés sont alors tous deux parallèles à la surface du prisme, ce qui ne peut que favoriser le recouvrement des deux faisceaux à l'interface.

Un autre avantage d'une telle configuration provient du fait que le CaF_2 n'a aucune contribution même non résonante (contrairement aux métaux) au signal SFG. Cette particularité rend plus aisée l'interprétation des spectres puisque ces derniers rendent uniquement compte des résonances de l'adsorbat analysé.

3.4 Chaîne de détection

Ce que nous appelons « chaîne de détection » désigne en réalité, tous les éléments se situant entre l'échantillon, où prend place la génération du signal SFG, et l'expérimentateur (Fig. 3.4).

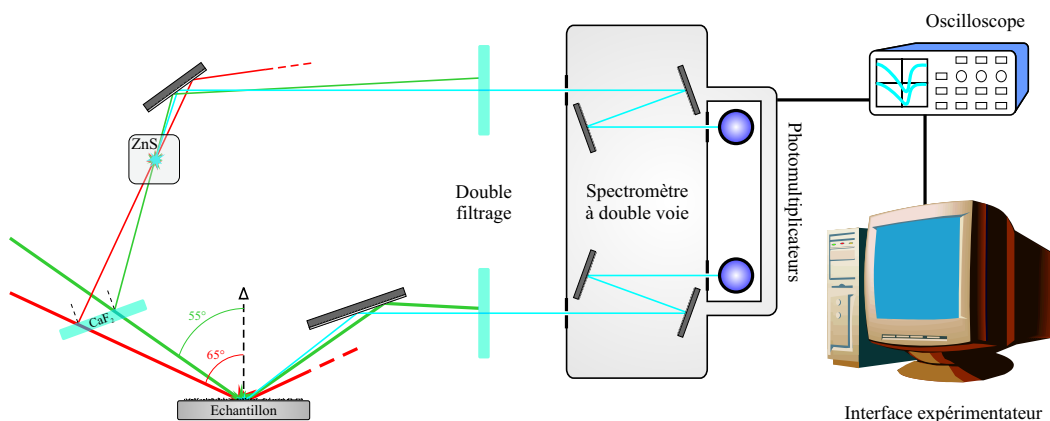


FIG. 3.4 – Chaîne de détection utilisée en spectroscopie SFG

Remarquons tout d'abord qu'avant même d'atteindre l'échantillon, une

partie (environ 5%) des faisceaux incidents est prélevée par une lame séparatrice en CaF_2 pour être ensuite focalisée dans un cristal non linéaire de ZnS , ne présentant pas de caractéristiques vibrationnelles dans la gamme considérée, afin de générer une polarisation intense de volume qui servira de référence pour normaliser le signal. En effet, l'intensité de cette référence est uniquement dépendante des fluctuations éventuelles de puissance des faisceaux infrarouge et visible. Ces dernières peuvent avoir des causes diverses liées à la configuration du laser ou à l'absorption par le milieu ambiant et ce à tous moments, même pendant les acquisitions ! Comme l'intensité du signal proprement dit est également dépendante de ces fluctuations mais aussi des résonances que nous souhaitons mettre en évidence, cela peut créer des artefacts dans nos spectres. Normaliser le signal de cette manière permet de lever cette dépendance aux fluctuations et de ne conserver ainsi que celle due aux résonances. En théorie, nous avons :

$$I_{signal} \propto \left| \chi_{interface}^{(2)} \right|^2 P_{IR} P_{Vis} \quad (3.1)$$

$$I_{reference} \propto \left| \chi_{ZnS}^{(2)} \right|^2 P_{IR} P_{Vis} \quad (3.2)$$

Après normalisation, nous obtenons :

$$I_{SFG} = \frac{I_{signal}}{I_{reference}} = \frac{\left| \chi_{interface}^{(2)} \right|^2}{\left| \chi_{ZnS}^{(2)} \right|^2} \quad (3.3)$$

Nous obtenons finalement une intensité SFG relative qui ne dépend plus des puissances des faisceaux incidents.

Nous comprenons alors que, du fait de cette normalisation, nous n'avons plus une mais deux lignes SFG dans la chaîne de détection et que toutes les descriptions qui vont suivre sont présentes en double dans le dispositif expérimental.

La chaîne de détection est un dispositif très sommaire. Il s'agit d'un photomultiplicateur qui transforme en électrons les quelques photons générés par un phénomène du second ordre de surface et amplifie alors le courant en résultant. Dans la pratique, les choses sont malheureusement plus compliquées. En effet, si nous nous référons à la relation qui exprime l'angle d'émission du faisceau SFG, nous pouvons nous rendre compte que ce dernier est très proche de l'angle de réflexion du faisceau visible. Pour des raisons évidentes, ce dernier est beaucoup plus intense et risque donc de noyer le signal. Il nous faut donc ajouter un dispositif qui a pour but d'isoler le signal

SFG de tous les photons parasites avant de l'amplifier à l'aide des photomultiplicateurs fonctionnant à leur tension maximale, à savoir 1200 V.

Pour parvenir à cette fin, nous procédons dans un premier temps à un double filtrage. Le premier, spatial, consiste simplement à faire passer le faisceau SFG à travers des diaphragmes afin de couper tout ce qui n'est pas parfaitement dans l'axe considéré. Le second, spectral, utilise des filtres holographiques SuperNOTCH à couches interférentielles qui sont opaques pour une longueur d'onde de 532 nm, en d'autres mots, qui bloquent le faisceau visible tout en laissant passer la SFG.

Dans une seconde étape, le signal est envoyé dans un spectromètre à double voie développé au laboratoire en collaboration avec la « WOW Company » afin de réaliser un nouveau filtrage spectral de haute performance grâce à deux réseaux « blazés ». En effet, il permet de n'obtenir en sortie que les photons à la fréquence-somme à l'exclusion de toutes les autres longueurs d'onde. Ces derniers, parviennent alors sur les photomultiplicateurs qui génèrent un courant électrique mesurable sur un oscilloscope synchronisé sur le signal de déclenchement de l'oscillateur. Le tout est bien entendu connecté via un port RS232 à un ordinateur qui acquiert les données et les présente à l'utilisateur via une interface « Labview » développée par le Dr. André Peremans.

Chapitre 4

Un biocapteur modèle : le système biotine-avidine

4.1 Introduction

En 1970, alors que seules une quinzaine de structures protéiques sont connues, Jacques Monod explique l'importance cruciale de la stéréospécificité et des interactions non covalentes dans le fonctionnement des êtres vivants [23]. Les protéines constituent de véritables machines microscopiques spécialisées dans une tâche précise dont l'efficacité repose sur la formation de complexes stéréospécifiques. C'est grâce au positionnement très précis des molécules impliquées qu'un enzyme particulier, par exemple, catalyse une réaction chimique. Le fait que ces complexes soient stabilisés par des interactions non covalentes est tout aussi essentiel : les complexes doivent pouvoir se former et se dissocier sans consommation excessive d'énergie. Notre compréhension du fonctionnement des cellules dépend donc en grande partie de notre capacité à mettre en évidence ces complexes, leurs rôles respectifs, leurs formations et leurs dissociations.

Aujourd'hui, beaucoup de techniques analytiques détectent l'événement de reconnaissance moléculaire à l'aide des biocapteurs. Elles peuvent être utilisées pour l'analyse du phénomène de reconnaissance lui-même (savoir si telle molécule interagit avec telle autre) ou pour la mesure de la concentration d'une protéine cible. Dans tous les cas, le système de reconnaissance doit être couplé à un transducteur électrochimique ou physique. A titre d'exemples, nous pouvons citer comme transducteurs des mesures de fluorescence ou de quantité adsorbée à l'interface (résonance plasmon, microbalance à quartz, ...).

4.2 Mais qu'est-ce qu'un biocapteur ?

Un biocapteur est, au sens où nous l'entendons, composé d'une monocouche de molécules biologiques « sondes » adsorbées de manière covalente sur une surface, ces molécules devant présenter une certaine affinité pour une autre espèce biologique bien particulière. En présence d'une solution de molécules « cibles », ce dispositif réagit ou non en fonction de la présence ou de l'absence de reconnaissance moléculaire entre les deux espèces (Fig. 4.1). Il semble évident que, pour que le dispositif soit efficace, il ne doit pas réagir lorsque la molécule cible n'est pas celle pour laquelle le système a été conçu. Cette propriété, véritable clé de voûte du processus, est appelée la *sélectivité* du biocapteur. Comme nous nous en rendrons compte plus tard, nous avons, aux cours de nos expériences, ménagé une procédure particulière pour tester la sélectivité de notre système.

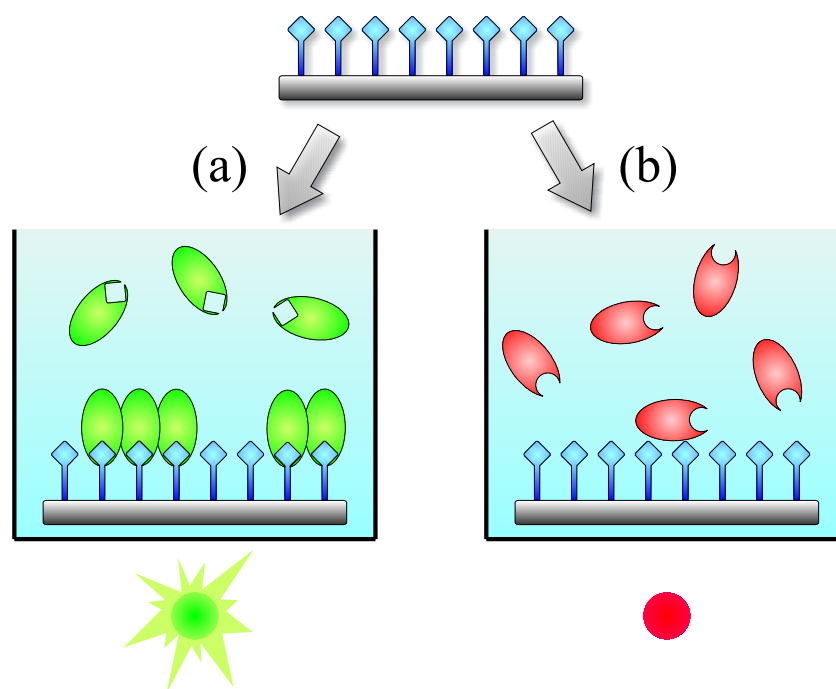


FIG. 4.1 – Représentation schématique d'un biocapteur (a) en présence d'une solution de molécules cibles présentant une affinité pour les sondes ; (b) en présence d'une solution de molécules cibles ne présentant pas d'affinité

Une autre propriété importante relative aux biocapteurs est leur *sensibilité*, c'est-à-dire leur capacité à détecter une molécule cible dans une solution de basse concentration. Il va sans dire que plus la reconnaissance entre les

deux molécules en présence se fait à concentration faible plus la sensibilité du capteur est grande. Remarquons que ces deux caractéristiques des biocapteurs sont principalement déterminées par le choix des molécules sondes en fonction des molécules cibles que nous souhaitons détecter.

Afin de mieux comprendre le principe et la puissance d'un biocapteur, nous pouvons expliquer sommairement le fonctionnement d'un des biocapteurs les plus célèbres, le biochip ADN. Ce dernier est en réalité composé d'une multitude de petits biocapteurs répartis sur une surface sous forme de plots. Chacun de ces plots porte une séquence sonde d'ADN simples brins connue par l'expérimentateur. Ce dispositif est alors placé en présence d'une solution contenant des séquences cibles d'ADN simples brins, cette fois-ci inconnue de l'expérimentateur. Comme le veut la reconnaissance moléculaire, les ADN cibles vont venir s'hybrider aux ADN sondes si et seulement si ces derniers sont complémentaires. En examinant quels plots ont effectivement réagi, l'expérimentateur peut alors déterminer quelles étaient les séquences d'ADN inconnues dans la solution exposée au biocapteur. En simplifiant énormément la réalité biologique, nous pouvons par exemple prendre le cas concret d'un biochip portant des gènes (ou parties de gènes) connus de certaines maladies. En l'exposant alors au sang d'un patient, nous pouvons, en fonction de la réaction de certains plots, déterminer quels sont les gènes présents et, de cette manière, dépister les pathologies dont le patient est atteint (Fig. 4.2). Bien que nous ne nous en rendions pas toujours compte, il existe aujourd'hui une multitude d'utilisations pratiques des biocapteurs dans notre vie de tous les jours comme par exemple, les tests sanguins, les tests de paternité, ...

Il va sans dire qu'un biocapteur n'est rien sans un système de lecture efficace qui permet de déterminer si la reconnaissance a eu lieu. Dans le cas des biocapteurs, la reconnaissance moléculaire est souvent sondée à l'interface solide/liquide puisque la construction du biocapteur implique que la sonde soit fixée sur une structure rigide en contact avec la solution de molécules cibles. Dans cette optique, bon nombre de techniques ont déjà été essayées pour la lecture de tels dispositifs, avec plus ou moins de succès. Les plus courantes et les plus maîtrisées sont la fluorescence et la résonance de plasmons de surface [24][25][26]. Citons également la microscopie à force atomique [27][28] et la spectroscopie d'absorption visible et ultraviolette [29][30]. Plus récemment, des techniques comme la spectroscopie Raman [31][32] et la spectroscopie infrarouge (FT-IRRAS) [33][34] ont été appliquées à ce problème, avec l'avantage de procurer de l'information vibrationnelle. Ceci permet, en plus de détecter la reconnaissance, d'identifier les espèces en présence. Cependant, ces techniques ne permettent pas de déduire d'autres informations sur la conformation du capteur et nécessitent l'utilisation de

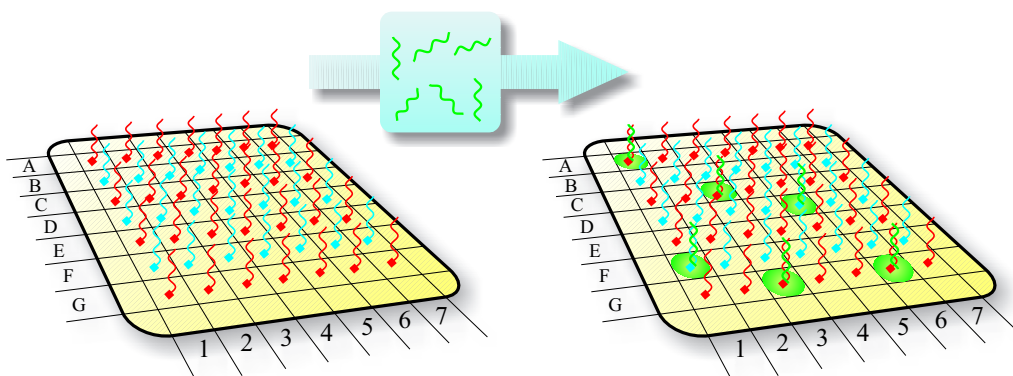


FIG. 4.2 – Représentation schématique d'un biochip ADN avant et après interaction avec une solution d'ADN cibles. Dans ce cas, le biochip détecte la présence des gènes A1, C3, D5, F1, G3 et G6.

marqueurs pour différencier la sonde de la cible.

Au cours de ce travail, nous avons choisi d'étudier un système modèle afin d'éprouver notre technique, la spectroscopie SFG, face à un premier « biocapteur-test ». Il s'agit du complexe biotine-avidine. Ce système a été énormément étudié dans la littérature [35][36][37] car l'avidine se lie à la biotine avec une des plus fortes affinités connues en biologie (constante de dissociation $K_d \sim 10^{-15} M$) [38]. Signalons également que le complexe biotine-avidine est dépendant de la force ionique du milieu mais relativement stable sur une large gamme de pH et de température.

Le but de ce mémoire sera donc de montrer que la spectroscopie SFG est capable, en plus de fournir une information vibrationnelle de l'interface, de lire notre biocapteur, c'est-à-dire de déterminer quand la reconnaissance moléculaire a effectivement lieu. Dans le cas du système biotine-avidine, nous sommes déjà sûr de la sélectivité et de la sensibilité du capteur au niveau des molécules en présence. Il reste à montrer que notre technique est capable d'en rendre compte sans nous fournir de résultats erronés.

4.3 Le complexe biotine-avidine

4.3.1 La biotine

La biotine, ou vitamine H ou B8, est une vitamine hydrosoluble constituée d'un noyau imidazoline et d'un cycle tétrahydrothiophène porteur d'une chaîne latérale à cinq atomes de carbone (Fig. 4.3). Elle est stable à la chaleur

et en solution aqueuse. De plus, elle est peu sensible à l'oxydation.

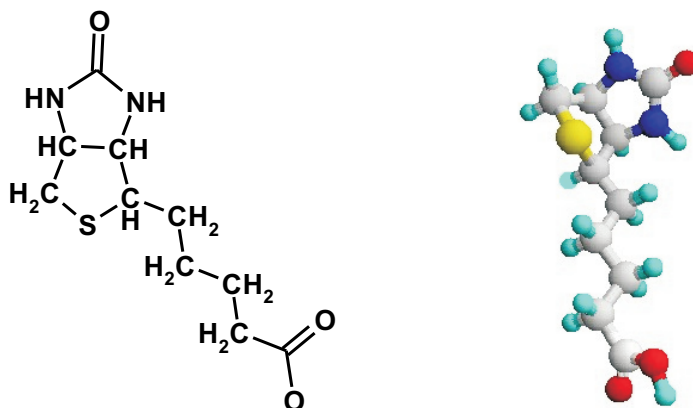


FIG. 4.3 – Représentation schématique et stéréoscopique de la molécule de biotine ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$)

Les vitamines sont des molécules organiques requises en très faibles quantités en comparaison des quantités relativement grandes d'acides aminés essentiels et d'acides gras. Elles font partie des nutriments essentiels et une molécule n'est donc pas une vitamine par définition si l'organisme peut l'élaborer. Des doses infimes de vitamines suffisent car la majorité de ces molécules servent de coenzymes et ont, par conséquent, des fonctions catalytiques. Bien que nos besoins en vitamines s'avèrent modestes, ces molécules sont absolument essentielles. En effet, des carences peuvent causer des syndromes graves. En fait, la première vitamine, la thiamine fut découverte à la suite de recherches sur les causes d'une maladie mystérieuse appelée béri-béri.

Jusqu'à présent, 13 vitamines essentielles pour les humains ont été dénombrées. Elles sont divisées en deux catégories : les vitamines hydrosolubles et les vitamines liposolubles. Les vitamines hydrosolubles comprennent les vitamines du complexe B, qui consistent en plusieurs composés servant généralement de coenzymes dans des processus métaboliques importants.

La biotine est entièrement apportée par l'alimentation. L'apport journalier moyen est de 3 à 6 microgrammes. Elle est présente dans de nombreux aliments, les fruits, les viandes, en particulier dans le foie. Les mécanismes d'absorption de la biotine sont mal connus, il s'agirait d'un processus actif, dépendant du sodium et saturable. Son rôle dans l'organisme est multiple ; elle intervient par exemple dans la synthèse des acides gras, comme coenzyme spécialisé dans le transport des radicaux CO_2 et dans la production d'énergie à partir du glucose et des acides aminés branchés, constituants majeurs du

muscle. Les carences en biotine sont très rares chez l'adulte. Elles se voient seulement au cours d'une alimentation riche en avidine (blanc d'œuf cru). Cette vitamine est également utilisée en pharmacie pour traiter certaines alopecies (chute de cheveux). L'utilisation de la biotine en thérapeutique ne semble pas avoir provoqué d'effets indésirables [39].

4.3.2 La biocytine

Dans la nature, la biotine existe sous trois formes : la biotine libre, la biocytine de levure et la biotoprotéine (combinaison biotine-protéine). La biocytine, ou biotinyl L lysine, est la molécule que nous avons utilisée principalement dans nos expériences. Il s'agit simplement d'une biotine en liaison covalente avec un acide aminé essentiel : la lysine ou acide diaminocaproïque (Fig. 4.4).

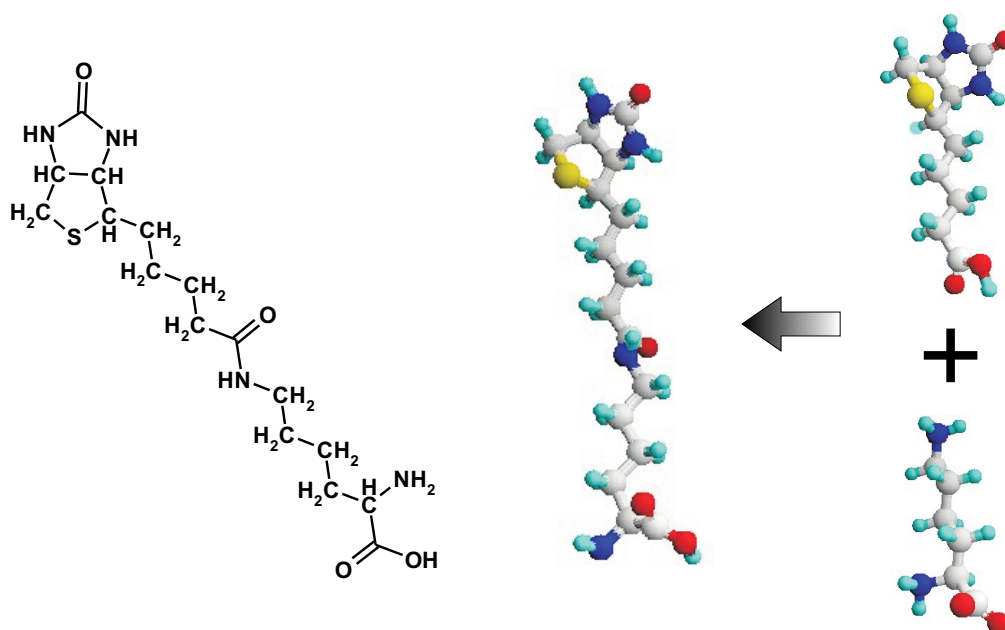


FIG. 4.4 – Représentation schématique et stéréoscopique de la biocytine ($C_{16}H_{28}N_4O_4S$) composée d'une biotine ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) et d'une lysine ($C_6H_{14}N_2O_2$)

Dans la pratique, cette molécule possède les mêmes affinités que la biotine mais est plus favorable à la formation de monocouches auto-assemblées car elle possède une chaîne carbonée plus longue rattachée à son cycle, ce qui

favorise une meilleure organisation par interactions de Van der Waals [40].

Comme nous le verrons par la suite, nous avons utilisé différents types de substrats au cours de nos expériences. Si la biocytine avec son groupement terminal carboxylique peut directement être utilisée pour la formation de monocouches auto-assemblées sur des surfaces de type CaF_2 ou Ag [41][42], il n'en va pas de même pour les substrats métalliques de type Au ou Pt . En effet, il est bien connu que pour ce genre de surface, il est plus favorable d'utiliser un groupement terminal thiol [43][44][45]. Afin d'utiliser la biocytine dans les meilleures conditions sur ce type de substrats, nous avons procédé à une modification chimique de notre molécule dans le but d'en changer le groupement terminal. Cette manipulation consiste simplement à faire réagir la biocytine avec une quantité équimolaire d'hydrochlorure de 2-iminothiolane pendant deux heures en présence de triéthylamine [46]. Nous obtenons alors un « thiol biotiné » que nous pouvons utiliser directement sur l'or et le platine pour la formation de monocouche autoassemblée. Dans la suite de ce travail, nous l'écrirons « biotSH ».

4.3.3 L'avidine

Sur le plan de la structure, les protéines sont les molécules les plus complexes que nous connaissons. Tout comme leurs fonctions, leur structure varie considérablement. Mais bien qu'elles soient très diversifiées, les protéines sont toutes des polymères élaborés à partir des mêmes constituants, les acides aminés.

L'avidine est une glycoprotéine que nous pouvons trouver dans le blanc d'œuf cru [37]. Elle est constituée de quatre poches de liaison biotine positionnées par paires sur les faces opposées de la protéine, ce qui lui confère une structure tétramérique. Chaque monomère est constitué d'une chaîne de 128 acides aminés (15.800 Da par monomère). Comme nous l'avons déjà signalé ci-dessus, elle possède une affinité particulièrement forte pour la biotine, pour laquelle la constante de dissociation est de trois ordres de grandeur supérieure aux constantes rencontrées habituellement en reconnaissance moléculaire.

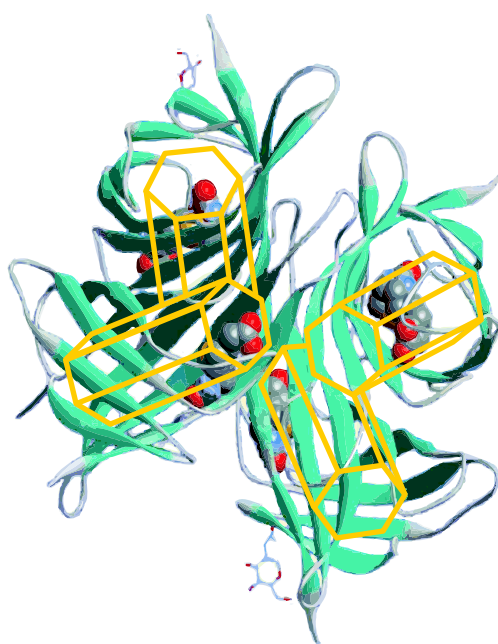


FIG. 4.5 – *Structure tétramérique de l'avidine et représentation schématique des quatre monomères sous forme de prismes hexagonaux (Figure adaptée de [47])*

Chapitre 5

Résultats expérimentaux

5.1 Introduction

La démarche que nous allons suivre au cours de nos expériences comprend deux étapes. La première consiste à former des monocouches de molécules sondes sur divers substrats. Ces substrats seront ensuite étudiés par spectroscopie SFG, ce qui nous permettra de déterminer si la couche est effectivement formée et organisée. La seconde étape consistera à exposer ces différentes couches à différentes solutions de molécules cibles et à mettre en évidence la reconnaissance moléculaire s'il y a lieu. Dans le cas contraire, notre dispositif ne devra pas réagir afin de conserver la sélectivité du capteur.

Dans un premier temps, nous avons investigué les gammes spectrales les plus facilement accessibles à notre dispositif laser. Il s'agit de la gamme spectrale des $C-H$ s'étendant de 2800 à 3000 cm^{-1} et de la gamme spectrale des $N-H$ qui s'étend de 3000 à 3500 cm^{-1} . En effet, afin d'obtenir un faisceau infrarouge accordable dans ces gammes de fréquence, nous avons utilisé le cristal non linéaire de $LiNbO_3$ qui est le plus aisé à mettre en oeuvre expérimentalement. Une étude complémentaire dans d'autres gammes spectrales a été effectuée postérieurement dans le cadre d'un mémoire de licence par Damien Duvivier [48].

Signalons que toutes nos expériences ont été réalisées ex-situ. Nous avons essayé de les reproduire in-situ lors du contact avec la solution de protéine mais sans parvenir à obtenir des résultats significatifs. En particulier lors de l'utilisation du prisme en configuration TIR, l'ajout d'une solution modifie l'indice de réfraction du milieu se trouvant derrière la surface, ce qui entraîne la perte des conditions de réflexion totale. Le champ électrique interfacial est donc réduit, donnant lieu à un signal SFG trop faible pour être détecté par notre dispositif.

5.2 Importance du substrat

Comme nous l'avons mentionné précédemment, nous avons utilisé différents types de substrats au cours de nos expériences. Ces derniers peuvent se diviser en deux catégories, si nous considérons d'une part, les substrats métalliques et d'autre part, les substrats isolants.

5.2.1 Substrats métalliques

Des mesures de spectroscopie SFG ont été réalisées sur différents métaux : l'or, le platine et l'argent. L'utilisation de tels substrats permet la formation aisée de monocouches auto-assemblées à l'aide de groupement thiols et constitue une sorte de standard (en particulier pour l'or) dans le domaine des biocapteurs.

Les échantillons d'or que nous avons utilisés sont produits par *ArrandeeTM* et sont en réalité composés d'un dépôt d'or sur une plaquette de verre. Cette dernière a une épaisseur de 1,1 mm pour une couche d'or d'environ 250 nm. Entre les deux, le fabricant applique une mince couche de chrome d'environ 2,5 nm. Celle-ci garantit une adhérence optimale et une meilleure épitaxie de la couche d'or. Ces échantillons sont fabriqués par croissance épitaxiale contrôlée.

Dans le cas du platine et de l'argent, il s'agit de monocristaux (111) préalablement polis à l'aide de différentes poudres diamantées de tailles dégressives afin d'éliminer toutes traces des précédents dépôts et de redonner à la surface une qualité « miroir » améliorant la réflexion des faisceaux.

En ce qui concerne les substrats en platine et en or, ceux-ci subissent également un recuit effectué au chalumeau propane/butane afin d'améliorer la qualité de la surface par réorganisation thermique. L'échantillon est alors exposé à la flamme jusqu'à ce qu'il rougisso, ensuite, il est retiré pour refroidir quelques instants. Cette procédure est répétée deux à trois fois et nous terminons en déposant une goutte d'eau ultra-pure sur la surface pour la protéger d'éventuels contaminants et assurer le refroidissement final.

L'inconvénient des substrats métalliques réside dans le fait que leur polarisation non linéaire de surface n'est pas nulle et qu'ils ajoutent donc une contribution aux spectres SFG. De plus, la contribution d'un métal dépend de la nature de ce dernier. Ceci a pour conséquence que même si les spectres SFG peuvent apparaître comme très différents, cela est généralement dû à la contribution non résonante des différents métaux utilisés. En effet, rappelons-nous que le signal SFG est proportionnel au carré du module de la polarisation à l'interface, c'est-à-dire au carré du module de la susceptibilité. Cette

dernière est en réalité la somme de plusieurs contributions qui proviennent aussi bien de l'adsorbat que du substrat proprement dit. La contribution métallique est définie par le terme de susceptibilité non résonante par opposition au terme résonant de l'adsorbat. Nous avons alors pour la susceptibilité totale d'ordre deux de l'interface :

$$\chi^{(2)} = \chi_{NR}^{(2)} + \chi_R^{(2)} \quad (5.1)$$

Dans le cas des métaux, nous pouvons séparer leur contribution en deux composantes, à savoir la contribution des électrons libres du métal, responsables des transitions intrabandes, et celle de ses électrons liés, responsables des transitions interbandes.

En ce qui concerne les premiers, nous pouvons nous référer à la théorie du jellium tout en nous rappelant que nous sommes dans le cadre de l'approximation dipolaire. Dans ce cas, la susceptibilité intrabande se résume à deux contributions, l'une fonction du potentiel appliqué à la surface et négligeable dans nos conditions expérimentales classiques et l'autre, qui sera la seule que nous considérerons, fonction de facteurs géométriques.

Quant à la contribution interbande, il n'existe pas, à proprement parler, de théorie qui modélise la contribution des électrons liés. Cependant, il est observé expérimentalement que les électrons de la bande de valence peuvent adopter le comportement des électrons libres en passant dans la bande de conduction suite à leur excitation par un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde adéquate. Ce phénomène se traduit par un brusque changement dans les propriétés non linéaires du métal considéré. Remarquons que l'importance de ces transitions dépend des propriétés électroniques du métal que nous utilisons. Ainsi, pour les métaux nobles comme l'or et l'argent, il existe une barrière énergétique à franchir qui nécessite un rayonnement visible ou ultraviolet. Dans ce cas, comme le dispositif expérimental que nous utilisons excite ces transitions par l'intermédiaire du faisceau visible ou SFG, la susceptibilité interbande domine les propriétés non linéaires car il y a beaucoup plus d'électrons liés que de libres. Pour les métaux de transition comme le platine, les transitions ne pourraient se produire que dans l'infrarouge lointain inaccessible à notre dispositif et c'est alors la susceptibilité intrabande qui domine.

Suite à ces constatations, nous remarquons que la partie non résonante de la réponse non linéaire varie lentement avec la fréquence infrarouge, au contraire de la partie résonante qui varie rapidement comme nous l'avons montré dans la section 2.3. Dans les spectres que nous avons réalisés, nous avons donc considéré que la contribution non résonante est constante ou dépendante de façon polynomiale simple vis-à-vis de la fréquence infrarouge.

Remarquons que cette approximation est valable dans le cas de mesures ex-situ comme celles que nous avons effectuées. Dans le cas de mesures in-situ, d'autres paramètres entrent en compte et introduisent des problèmes plus complexes [45].

Une autre conséquence de la contribution non résonante des métaux est ce que nous appelons le *facteur d'interférence*. En effet, en sachant que l'intensité SFG est proportionnelle au carré du module de susceptibilité non linéaire totale de l'interface analysée et en sachant que $\chi_{NR}^{(2)}$ et $\chi_R^{(2)}$ sont des valeurs complexes, nous avons :

$$I_{SFG}(\omega_{IR}) = \left| \chi_{SFG}^{(2)}(\omega_{IR}) \right|^2 \quad (5.2)$$

$$= \left| \chi_{NR}^{(2)} + \chi_R^{(2)} \right|^2 \quad (5.3)$$

$$= \left| \chi_{NR}^{(2)} \right|^2 + \left| \chi_R^{(2)} \right|^2 + \chi_{NR}^{(2)} \chi_R^{(2)*} + \chi_{NR}^{(2)*} \chi_R^{(2)} \quad (5.4)$$

$$= \left| \chi_{NR}^{(2)} \right|^2 + \left| \chi_R^{(2)} \right|^2 + 2 \left| \chi_{NR}^{(2)} \right| \cdot \left| \chi_R^{(2)} \right| \cos \left[\arg(\chi_{NR}^{(2)}) - \arg(\chi_R^{(2)}) \right] \quad (5.5)$$

$$(5.6)$$

Nous observons que cette expression, loin d'une simple somme scalaire, comporte des termes d'interférence, semblables à ceux observés en optique ondulatoire, entre les contributions résonante et non résonante. L'interférence pourra être constructive, destructive ou nulle en fonction du comportement du cosinus, en d'autres termes, en fonction du déphasage existant entre les deux arguments. La phase est déterminée par plusieurs paramètres, comme le type de métal en présence, la nature de la molécule étudiée, la configuration expérimentale, ...

Il n'est pas étonnant alors d'observer des spectres SFG de formes différentes en fonction du substrat utilisé. En effet, nous avons généralement un facteur d'interférence constructif sur le platine, ce qui conduit à des résonances qui apparaissent sous forme de pics. Tandis que pour l'or, l'interférence est généralement destructive amenant à des creux. L'argent présente un cas intermédiaire où les résonances sont représentées sous forme de pics « papillons » asymétriques [44]. Il est évident que ce type de considérations est à garder à l'esprit lors de l'interprétation des spectres réalisés sur des métaux.

5.2.2 Substrats isolants

Comme mentionné précédemment, nous avons utilisé des prismes $\lambda/10$ en fluorure de calcium (Casix). Le CaF_2 est un cristal qui possède une très bonne transparence de 200 nm à 7 μm (Fig. 5.1). Son indice de réfraction est de 1,43 à 0,88 μm . Ce matériau est couramment utilisé pour la fabrication de composants optiques comme les fenêtres, les lentilles et les prismes. Ces derniers, en plus de nous permettre d'utiliser une configuration *TIR*, présentent l'avantage, grâce à leur transparence aux longueurs d'onde utilisées, de n'apporter aucune contribution au signal SFG, ce qui favorise grandement l'interprétation des spectres. La préparation de ce type de substrat nécessite une procédure chimique de type solution piranha.

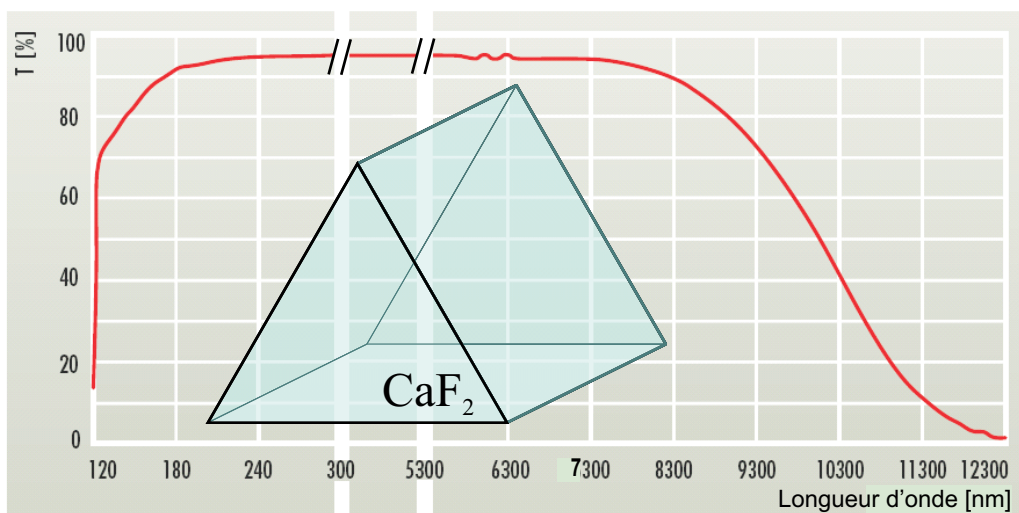


FIG. 5.1 – Courbe de transmission du CaF_2

5.3 Préparation des échantillons

En ce qui concerne la préparation des échantillons, tous les substrats sont préalablement passés dans un bain à ultra-sons avec de l'acétone, de l'éthanol et ensuite de l'eau ultra-pure pendant une dizaine de minutes. Pour les substrats en Ag(111) et en CaF_2 , les films de biocytine sont réalisés par immersion dans une solution 10 mM de biocytine (Aldrich) pendant deux heures. Le solvant utilisé est du trifluoroéthanol. Comme expliqué précédemment, les

liaisons de la biocytine sur ce type de substrat interviennent via le groupement carboxylique de la molécule.

Pour l’Au(111) et le Pt(111), la BiotSH est utilisée à la place afin de tirer parti de son groupement thiol terminal. Un traitement chimique plus complexe est donc nécessaire. Nous utilisons la même solution de biocytine que nous mélangeons avec un volume équivalent de solution 10 *mM* d’hydrochlorure de 2-iminothiolane dans le même solvant. Nous terminons la réaction en ajoutant du triéthylamine dans une proportion de 1,4 μl par *ml* de solution totale. Notons que tous les échantillons sont abondamment rincés avec le solvant et séchés sous un flux d’azote pour éviter la formation de multicouches.

Après analyse de la monocouche de biocytine, les échantillons sont immergés dans une solution 10^{-5} *M* d’avidine dans une solution tampon de type HEPES (10^{-2} *M*, $pH \sim 7,4$) pendant 16 heures avant d’être, à leur tour, rincés et séchés. L’utilisation d’une solution tampon est nécessaire lorsque nous travaillons avec des protéines afin de garantir qu’elles ne se dénatureront pas en raison d’un milieu trop acide ou salin par exemple.

5.4 Spectres SFG sur substrats métalliques

5.4.1 La monocouche de biocytine

Avant de parler de reconnaissance moléculaire avec l’avidine, nous devons vérifier que la biocytine s’est effectivement déposée sur le substrat et qu’elle a bien formé une monocouche auto-assemblée, c’est-à-dire où il règne un certain ordre. Les spectres SFG de la biocytine adsorbée sur substrats métalliques (Pt, Au, Ag) sont présentés à la figure 5.2 qui nous montre la gamme spectrale des $C-H$ s’étendant de 2800 à 3000 cm^{-1} .

Le spectre de la biocytine sur le platine nous révèle quatre résonances à 2860, 2875, 2915 et 2930 cm^{-1} . Par comparaison avec des mesures déjà réalisées sur un tel système par FTIR et en accord avec de précédents travaux réalisés par spectroscopie SFG [44], nous assignons les deux pics à 2860 et 2915 cm^{-1} aux vibrations d’élongation symétrique et antisymétrique des groupements méthylènes disséminés sur la chaîne alcane de la molécule. Dans une configuration « All trans », ces 8 groupements sont distribués de manière symétrique le long du squelette moléculaire et les vibrations des CH_2 ne devraient donc pas être actives en SFG. En effet, rappelons que les phénomènes du second ordre sont interdits dans les milieux centrosymétriques, ce qui est le cas de chaînes alcanes parfaitement alignées. L’observation de telles vibrations est une indication claire d’un certain nombre de défauts gauches

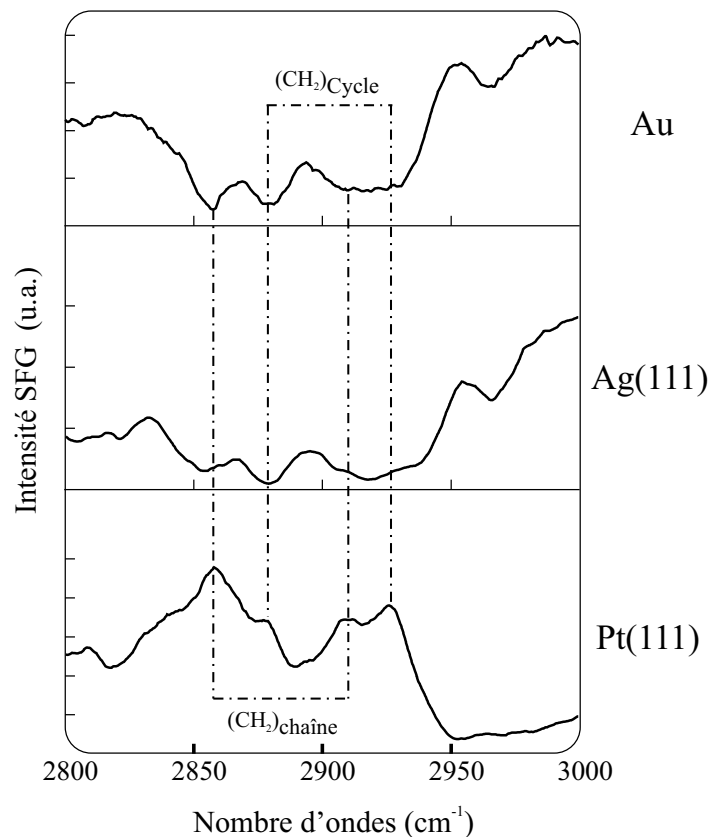


FIG. 5.2 – Spectres SFG de l'interface biocytine/métal

dans la monocouche de biocytine qui rompent la symétrie, rendant actifs les groupements considérés (Fig. 5.3).

Nous mettons ici en évidence un autre avantage de la spectroscopie SFG qui par ce type de déduction permet une estimation de l'ordre qui règne à l'interface étudiée. En effet, si un alignement trop parfait peut nuire au signal SFG pour raison de symétrie, il en va de même pour un désordre absolu qui est, en moyenne, centrosymétrique et donc non actif vis-à-vis des phénomènes d'ordre deux. Tout ceci fait de la spectroscopie SFG une technique sensible à l'ordre. La simple observation de résonances sur nos spectres peut déjà nous permettre de déduire que la monocouche est effectivement formée et qu'il y règne une certaine structure.

Les deux résonances à 2875 et 2930 cm^{-1} sont, quant à elles, attribuées aux vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique du groupement méthylène du cycle tétrahydrothiophène. L'augmentation de la fréquence de vibration de ce CH_2 par rapport à ceux de la chaîne alcane vient du fait que

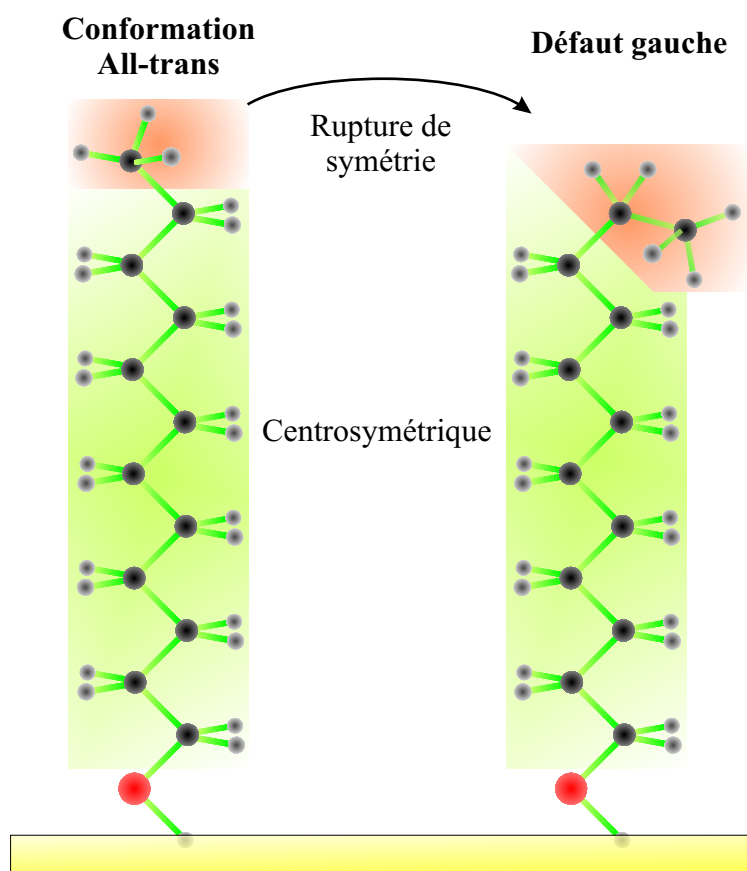


FIG. 5.3 – *Défaut gauche et rupture de symétrie dans une molécule simple, le dodécane-thiol*

ce dernier est lié à un atome de soufre. En effet, l'énergie de liaison $C-S$ est plus faible que celle d'une liaison $C-C$, ce qui entraîne plus de contraintes sur le groupement considéré. L'observation de ces résonances indique que tous les CH_2 de cycle pointent dans la même direction. Comme ces derniers font partie intégrante de ce cycle situé à l'apex de la molécule, nous obtenons une confirmation supplémentaire quant à l'ordre de la monocouche.

Notons également que dans la gamme des $N-H$ aucune résonance n'a été observée au cours de nos analyses.

En ce qui concerne les substrats d'or et d'argent, nous pouvons globalement observer les mêmes structures et donc tirer les mêmes conclusions. Nous remarquons cependant quelques petites différences. Premièrement, nous observons un léger déplacement en fréquence de certaines vibrations CH_2 . Ceci

est dû aux interactions de Van der Waals entre les chaînes qui varient en fonction du substrat. Deuxièmement, nous observons clairement la différence de fond non résonant et l'influence du terme d'interférence dont nous avons parlé précédemment. En effet, les résonances deviennent des vallées suite aux interférences avec la réponse non-linéaire du métal. Remarquons également, qu'il existe une autre petite différence avec le cas du platine. En effet, nous observons l'apparition d'une nouvelle structure spectrale à 2965 cm^{-1} qui est sans doute causée par une différence d'ordre dans le film.

5.4.2 Interaction avec l'avidine

Les monocouches de biocytine adsorbées sur substrat métallique sont ensuite exposées à la solution d'avidine. Les spectres réalisés sur un tel système sont présentés à la figure 5.4.

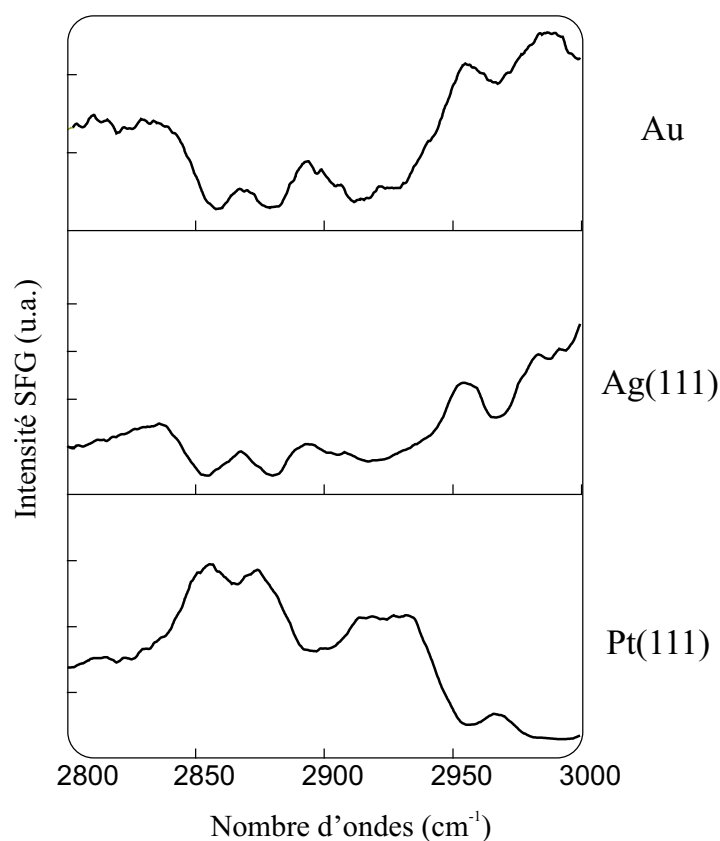


FIG. 5.4 – Spectres SFG de l'interface biocytine/métal après immersion dans une solution d'avidine

La première chose que nous remarquons est que les spectres réalisés sur l'or et l'argent ne sont pas modifiés. Ce qui signifie qu'il n'y a pas de reconnaissance moléculaire ou, du moins, qu'elle n'est pas détectée. Dans le cas du platine, nous observons de légères modifications qui peuvent être interprétées comme une interaction entre cible et sonde ou comme une réorganisation dans la couche de biocytine. Malheureusement, les effets sont trop faibles pour pouvoir affirmer que la reconnaissance moléculaire a bien eu lieu.

La raison probable de cette absence de changement est sans doute la dénaturation de la protéine par les faisceaux lasers. Dans cet ordre d'idées, la configuration TIR semble prometteuse puisque dans ce cas, l'interface n'est plus sondée directement par les faisceaux lasers mais par l'onde évanescente résultant de la réflexion totale.

5.5 Spectres SFG sur CaF_2

5.5.1 La monocouche de biocytine

Nous avons donc réalisé les mêmes expériences que précédemment mais en utilisant des prismes en CaF_2 comme substrat. Après immersion dans la solution de biocytine, nous obtenons le spectre présenté à la figure 5.5. Comme nous pouvons rapidement nous en rendre compte, nous observons les mêmes résonances que celles mises en évidence sur les substrats métalliques. Encore une fois, la gamme spectrale des $N-H$ est dépouillée de toute résonance. Nous pouvons donc en tirer les mêmes conclusions et en déduire qu'une monocouche orientée de biocytine, comportant toutefois un certain nombre de défauts gauches, s'est effectivement formée sur la base du prisme.

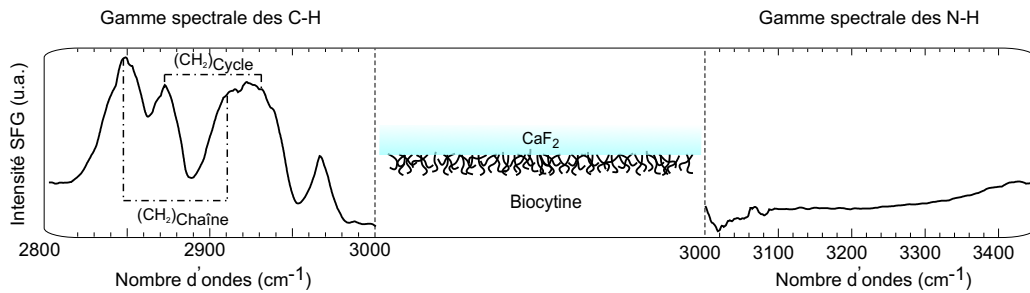


FIG. 5.5 – Spectres SFG de l'interface biocytine/ CaF_2

5.5.2 Interaction avec l'avidine

Après interaction avec la solution d'avidine, nous observons des modifications significatives dans le spectre SFG qui attestent de la reconnaissance moléculaire entre les deux espèces biologiques en présence (Fig. 5.6).

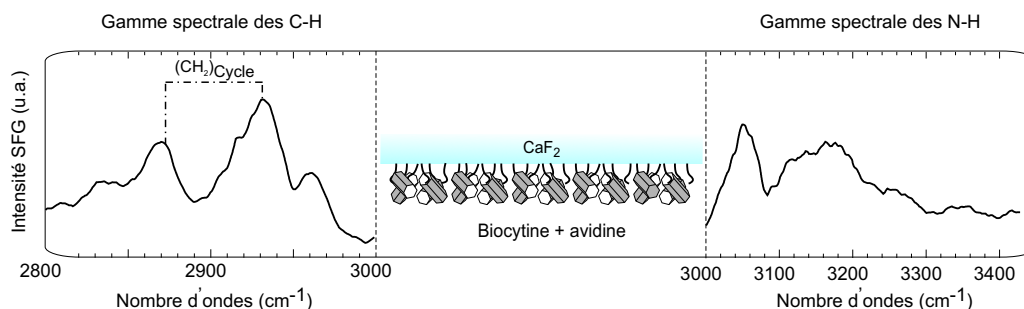


FIG. 5.6 – Spectres SFG de l'interface biocytine/ CaF_2 après immersion dans une solution d'avidine

Tout d'abord, nous observons, dans la gamme des $C-H$, l'atténuation drastique des résonances précédemment associées aux vibrations des CH_2 de chaîne à 2850 et 2915 cm^{-1} , ce qui indique une réorganisation de la couche de biocytine. Ceci traduit la disparition des défauts gauches responsables de l'activation de ces vibrations. Plus précisément, dans le but de concorder avec la poche de liaison de l'avidine, la chaîne alcane de la biocytine doit passer en conformation « all trans ». Dans ce cas, tous les CH_2 de chaîne s'alignent parfaitement de manière symétrique le long de l'axe de la molécule et constituent un milieu centrosymétrique et donc inactif en SFG. Par contre, les résonances associées aux CH_2 de cycle ne sont pas affectées par cette réorganisation comme le montrent les résultats expérimentaux.

Par ailleurs, la modification la plus révélatrice est l'apparition dans la gamme des $N-H$ de deux nouvelles résonances à 3050 et 3150 cm^{-1} . Au regard de la grande complexité d'un système comportant une vitamine imbriquée dans une protéine, il est difficile de trouver une interprétation à ces pics qui ne présente aucune ambiguïté. Nous pouvons cependant émettre des hypothèses quant à l'assignation de ces résonances en considérant plus en détail la poche de liaison de l'avidine lorsqu'une biocytine vient s'y fixer (Fig. 5.7).

La fréquence du pic apparaissant à 3050 cm^{-1} est caractéristique d'une vibration CH de cycle et peut donc être attribuée aux groupements de ce type en présence. Ils sont au nombre de deux, à savoir d'une part, les CH que possède la biocytine dans son cycle et d'autre part, un groupement CH

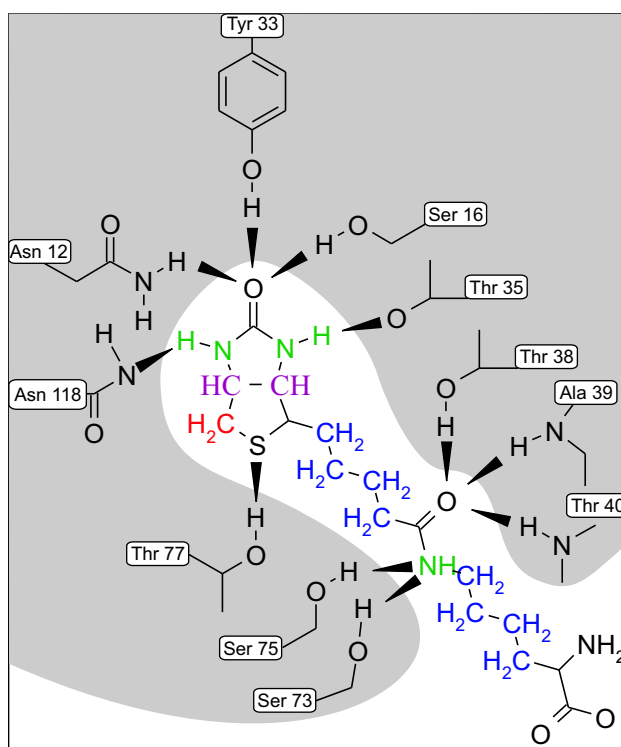


FIG. 5.7 – Schéma de principe de la poche de liaison de l'avidine montrant les acides aminés intervenant dans les liaisons par ponts hydrogènes (Figure adaptée de [47])

aromatique présent dans l'acide aminé *Tyr33* de l'avidine. La première hypothèse semblerait la plus convaincante si nous en croyons les spectres infrarouges réalisés sur de la biocytine en phase condensée qui présente également cette résonance. Dans les deux cas, l'activation en SFG d'un tel groupement réside sûrement dans un changement de conformation généré par l'interaction entre la sonde et la cible. Ce dernier confère une orientation particulière au groupement incriminé, ce qui contribue à un gain de cohérence qui se traduit par un signal SFG démultiplié.

En ce qui concerne la large résonance apparaissant à 3150 cm^{-1} , nous pouvons élaborer le même type de déduction. En effet, cette vibration se situant dans le domaine caractéristique des vibrations des groupements $N-H$, il nous reste à identifier les atomes d'azote en présence. En procédant par élimination, nous pouvons déjà exclure le groupement amine situé au pied de la molécule de biocytine car celui-ci ne prend pas part au processus d'in-

teraction avec la protéine. Nous pouvons également rejeter tous les $N - H$ de l'avidine qui n'y sont pas non plus impliqués. En effet, ces derniers sont observés en FT-IRRAS autour de 3300 cm^{-1} mais pas en SFG puisqu'ils sont distribués aléatoirement dans la protéine, ce qui les rend presque centrosymétriques. Par contre, tous les acides aminés impliqués dans la liaison avec la biocytine sont à considérer car ils possèdent un tel groupement et peuvent être orientés suite à la reconnaissance. De plus, leur groupement $N - H$ est, pour la plupart, impliqué dans un pont hydrogène avec la biocytine, ce qui peut expliquer ce déplacement en fréquence de la vibration. Les derniers atomes d'azote à considérer sont ceux de la biocytine impliqués dans la liaison avec l'avidine. Nous avons d'une part, les deux $N - H$ présents dans le cycle terminal et d'autre part, l'amide secondaire présente sur le squelette de la molécule. Comme précédemment, nous pouvons dire que ces derniers n'apparaissent pas dans les spectres SFG de la monocouche de biocytine à cause d'un manque d'organisation, mais que suite à la réorientation de la couche et à l'interaction avec la protéine, ils deviennent actifs pour un processus du second ordre. Remarquons que ces derniers sont également impliqués dans des ponts hydrogènes avec les acides aminés de la protéine. Notons également que, étant donné la largeur de la résonance, il est fort probable que cette dernière soit constituée de plusieurs contributions relatives aux différentes hypothèses émises ci-dessus.

Même si nous ne pouvons pas réellement établir avec certitude l'origine de ces deux résonances, ni si elles viennent de la biocytine et/ou de l'avidine, nous pouvons par contre affirmer qu'elles résultent de l'interaction entre les deux espèces biologiques. Ceci nous convient parfaitement, puisque c'est précisément cette interaction que nous voulons mettre en évidence à l'aide de notre technique et non la présence de telle ou telle molécule qui est évidente puisque nous avons préparé les échantillons dans cette optique. La spectroscopie SFG est donc capable de détecter le processus de reconnaissance moléculaire. Il nous reste à montrer qu'elle est également capable de rendre compte de la sélectivité de cette interaction.

5.6 Sélectivité du capteur

Comme nous l'avons déjà précisé précédemment, nous savons que le système biotine-avidine interagit de manière spécifique. Nous devons cependant montrer que la spectroscopie SFG est sensible à cette sélectivité. Pour ce faire, nous avons utilisé d'autres molécules cibles qui ne présentent pas d'affinité particulière pour la biocytine ou qui ne peuvent interagir avec celle-ci. Le résultat escompté pour cette expérience est paradoxalement, une absence de

résultat puisque nous ne souhaitons pas que notre dispositif détecte une reconnaissance qui n'a pas lieu.

Dans un premier temps nous avons donc reconduit nos expériences en utilisant à nouveau l'avidine comme molécule cible. Cependant, afin d'empêcher cette dernière d'interagir avec la monocouche de biocytine, nous l'avons préalablement saturée, c'est-à-dire que nous avons bouché ses quatre poches de liaisons avec quatre molécules de biotine afin de la rendre inactive, faute de site de liaisons.

Pour réaliser cette procédure, nous avons en pratique, préparé une solution d'avidine selon la méthode décrite précédemment. Nous ajoutons ensuite des molécules de biotine en excès, c'est-à-dire plus de quatre équimolaires afin d'être certains que tous les sites actifs de la protéine soient effectivement occupés.

En second lieu, nous avons utilisé comme molécule cible une autre protéine proche de l'avidine. Il s'agit de la bovidine ou bovine serum albumin (BSA) qui est une protéine jouant un rôle important dans le maintien du pH du sang. Elle possède un poids moléculaire et un point isoélectrique proches de ceux de l'avidine mais ne possède aucune affinité particulière pour la biocytine. La BSA possède une réputation de protéine « collante » qui se dépose sur tout type de surface. Il ne fait donc aucun doute qu'il en subsistera sur notre surface après exposition de la monocouche de biocytine à notre solution de BSA. Malgré cela, il est à espérer que, même dans ces conditions extrêmes, la spectroscopie SFG ne détectera pas une reconnaissance erronée.

Pratiquement, la BSA nécessite les mêmes conditions environnementales que l'avidine et nous pouvons donc utiliser la même procédure que pour cette dernière en ce qui concerne la préparation de la solution.

Les spectres SFG obtenus après immersion de la monocouche de biocytine dans ces deux nouvelles solutions de molécules cibles sont présentés dans le tableau récapitulatif de la figure 5.8. Comme nous pouvons le constater, nous y observons les mêmes structures que celles apparaissant sur les spectres de la monocouche seule. Par contre, les résonances mises en évidence dans la gamme des $N - H$ après utilisation de l'avidine n'apparaissent pas. Ceci signifie que même si certaines molécules cibles se sont déposées sur la surface, elles ne donnent pas de signal SFG, faute d'interaction cohérente avec la monocouche auto-assemblée de molécules sondes. Il subsiste sans doute un tel dépôt, en particulier dans le cas de la bovidine, mais celui-ci est complètement désordonné et donc, globalement centrosymétrique. Cette constatation fait de la spectroscopie SFG une technique, non seulement sensible au processus

de reconnaissance moléculaire, mais aussi rendant compte de la sélectivité d'un tel processus, ce qui est capital dans le chef des biocapteurs.

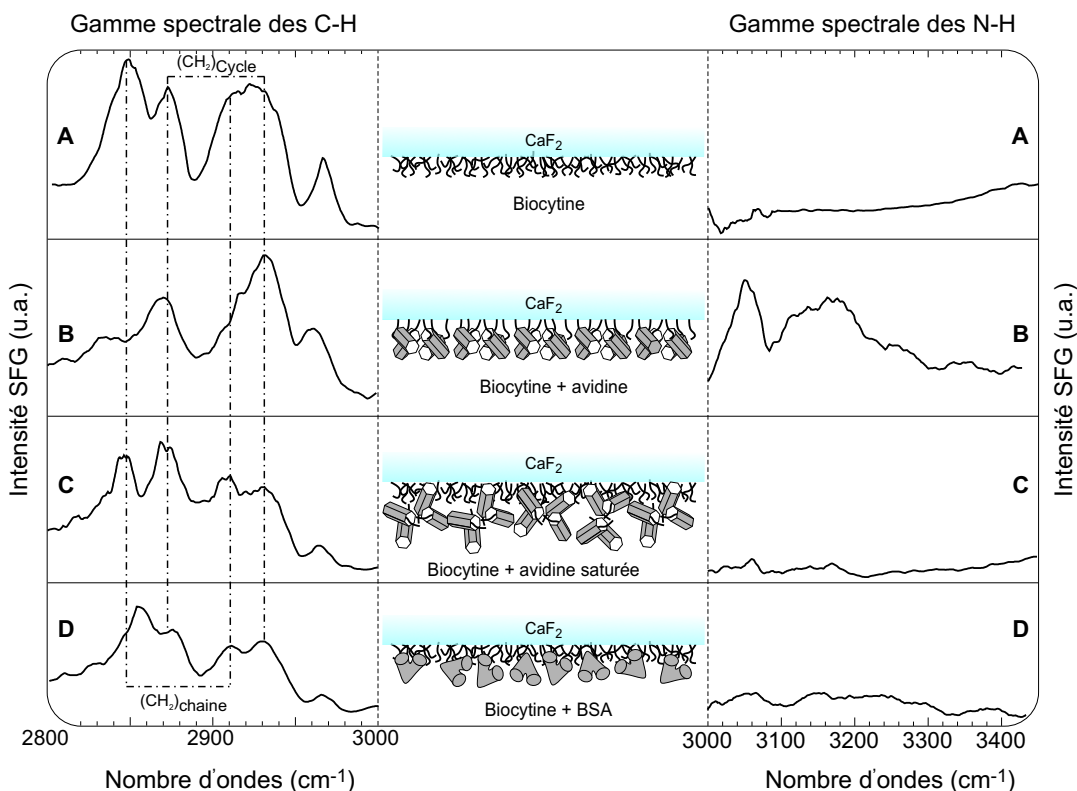


FIG. 5.8 – Tableau récapitulatif des spectres SFG obtenus sur substrat de CaF_2 (a) après formation de la monocouche de biocytine ; et après immersion de cette couche (b) dans une solution d'avidine ; (c) dans une solution d'avidine saturée ; (d) dans une solution de BSA (Figure adaptée de [49])

5.7 Comparaison avec les spectres FT-IRRAS

Au vu de l'interprétation des spectres SFG développée précédemment, nous comprenons aisément que l'analyse complémentaire des spectres infrarouges peut s'avérer très intéressante. Dans cette optique, le Dr Laurent Dreesen a réalisé la même série d'expériences que celle décrite ci-dessus en utilisant la technique FT-IRRAS. Notons que seule la série de mesures impliquant la bovidine n'a pas été reproduite. Nous présentons dans ce paragraphe quelques observations supplémentaires déduites de l'analyse de tels spectres.

En ce qui concerne les spectres réalisés sur la monocouche de biocytine, nous n'observons pas les résonances à 2875 et 2930 cm^{-1} du groupement méthylène du cycle tétrahydrothiophène (Fig. 5.9). En effet, ces vibrations ne sont pas remarquées parce que cette technique donne un signal proportionnel au nombre d'entités moléculaires en présence. Leur signal est donc noyé dans celui des groupements méthylènes de la chaîne alcane, beaucoup plus nombreux. En SFG, le signal obtenu est directement corrélé à l'ordre et à l'orientation des molécules.

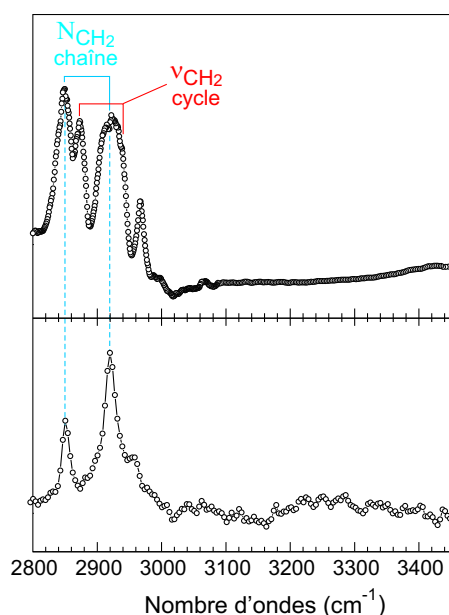


FIG. 5.9 – Comparaison entre les spectres SFG (en haut) et FT-IRRAS (en bas) d'une monocouche de biocytine adsorbée sur CaF_2 (Figure adaptée de [50])

En toute rigueur, la fixation de la biocytine sur les substrats en CaF_2 est confirmée par l'étude des spectres FT-IRRAS dans la gamme spectrale de la vibration CO (Fig. 5.10). En effet, nous pouvons y observer l'absence de vibration $\text{C}=\text{O}$ du groupement carboxylique de la molécule et l'apparition d'une vibration $\nu_a\text{COO}^-$ qui indique la présence de molécules déprotonées [50]. La biocytine est donc liée au substrat par les deux atomes d'oxygène de l'ion carboxylate.

En ce qui concerne l'interaction de la monocouche de biocytine avec l'avidine, nous pouvons également observer la présence de cette dernière par

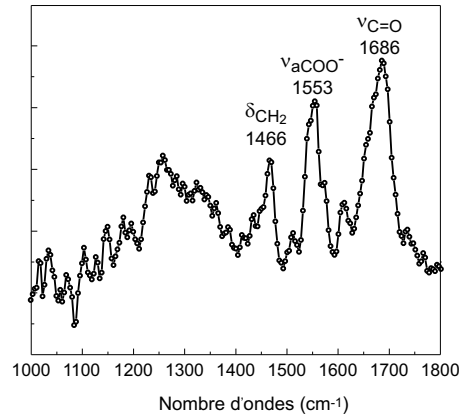


FIG. 5.10 – Spectre *FT-IRRAS* d'une monocouche de biocytine adsorbée sur CaF_2 (Figure adaptée de [50])

l'apparition d'une résonance caractéristique des protéines à savoir l'amide A, située autour de 3300 cm^{-1} (Fig. 5.11). Malheureusement, cette vibration est également observée lors de l'utilisation d'avidine saturée. La spectroscopie infrarouge est donc capable de détecter la présence ou non de molécules cibles mais n'est pas sensible au processus sélectif de la reconnaissance moléculaire.

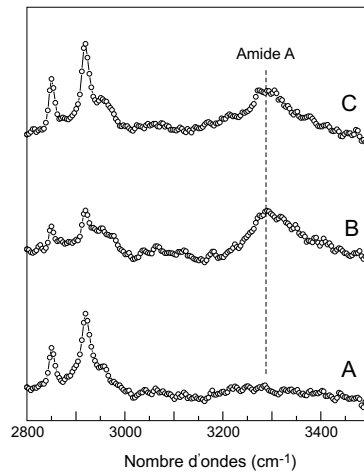


FIG. 5.11 – Spectres *FT-IRRAS* de l'interface biocytine/ CaF_2 (a) après formation de la monocouche de biocytine; et après immersion de cette couche (b) dans une solution d'avidine; (c) dans une solution d'avidine saturée (Figure adaptée de [50])

5.8 Le point sur les différentes techniques de détection

Arrivés à la fin de nos expériences, il nous semble judicieux de réaliser une petite étude comparative sur les performances que peut offrir la spectroscopie SFG en terme de détection de biocapteur. Pour ce faire, nous avons compilé dans un tableau à double entrée, les principales techniques utilisées actuellement dans un tel contexte vis-à-vis des caractéristiques observées pour la spectroscopie SFG dans le cadre du système biocytine-avidine (Fig. 5.12).

Technique Propriété	Fluorescence	Résonance de plasmon de surface	FT-IRRAS	Spectroscopie SFG
Détection reconnaissance	✓	✓	✓	✓
Absence de marqueurs	✗	✓	✗	✓
Information spectroscopique	✗	✗	✓	✓
Détection sélective	✗	✓	✗	✓

FIG. 5.12 – Comparaison des performances des principales techniques de détection utilisées pour les biocapteurs

Comme nous l'avons déjà expliqué, toutes ces techniques sont capables de détecter la reconnaissance de la biocytine par l'avidine. Néanmoins, deux d'entre elles nécessitent l'utilisation de marqueurs, qu'ils soient fluorescents ou infrarouges, pour y parvenir. Comme nous pouvions nous y attendre, seules les techniques spectroscopiques nous livrent une information vibrationnelle permettant l'analyse détaillée de l'interface. Notons que même si nous n'en avons pas parlé dans ce mémoire, seule la spectroscopie SFG serait à même de fournir une information spectroscopique dans le domaine du visible.

Une petite remarque est à formuler quant à la propriété de détection de la sélectivité. Cette propriété a été confirmée pour la SFG et infirmée pour l'infrarouge dans le cas de l'étude du système biocytine-avidine. Il est difficile de se prononcer en ce qui concerne la fluorescence et la résonance de plasmons de surface faute de données expérimentales réalisées sur un tel

système. Cependant, au vu des spectres FT-IRRAS présentés, il semble logique de penser qu'un dépôt d'avidine saturée se forme sur la monocouche de biocytine. Ceci laisse à penser que ce dernier serait effectivement détecté par ces deux techniques pour des raisons évidentes. Malgré cela, si nous en croyons la littérature, la résonance de plasmon de surface serait quand même capable de mettre en évidence cette sélectivité [24]. En effet, il faut savoir que de telles mesures se réalisent sous un flux constant de solution de molécules cibles. Nous pouvons alors supposer que le dépôt que nous avons mentionné ne se forme pas dans de telles conditions. Évidemment, ce type d'affirmation nécessiterait une étude plus poussée.

Sur ce tableau, nous pouvons observer que la spectroscopie SFG remplit toutes ses promesses et présente donc une bonne alternative à la détection de biocapteurs. Néanmoins, signalons que ce qui fait la richesse de cette technique fait également sa complexité. En effet, outre un dispositif expérimental lourd, l'interprétation de spectres SFG n'est pas immédiate et nécessite une étude approfondie du système considéré. Ce n'est qu'une fois ce travail réalisé que nous pouvons accéder, non seulement à la détection de la reconnaissance mais aussi à toute une série d'informations comme la conformation des molécules sondes, les groupements orientés, ... rendues accessibles par la dimension spectroscopique de notre technique.

Conclusions et perspectives

Arrivés au terme de ce travail de recherche, nous pouvons faire le point sur ce que nous avons réalisé. Tout d'abord, nous avons montré que nous pouvions former une monocouche de biocytine aussi bien sur des substrats métalliques, comme le platine, l'or ou l'argent, que sur des substrats isolants comme le fluorure de calcium. La spectroscopie SFG nous a permis de caractériser cette couche et de déterminer qu'elle comporte un certain nombre de défauts gauches. Même si nous n'avons pu détecter la reconnaissance de l'avidine sur les métaux, sans doute en raison de la dénaturation de cette dernière, une modification significative des spectres SFG se produit dans le cas des substrats en CaF_2 . Suite à l'interprétation des résonances, nous avons démontré que ces changements sont révélateurs de la reconnaissance entre molécules cibles et molécules sondes. Nous avons également mis en évidence une réorganisation de la monocouche de biocytine suite à cette interaction avec la protéine. Ces constatations nous permettent de réaliser notre premier objectif, à savoir montrer que la spectroscopie SFG est une technique adaptée à la détection de biocapteurs.

Dans une seconde étape, nous avons exposé la monocouche de vitamines à d'autres molécules cibles ne présentant pas d'affinité particulière pour les molécules sondes. Ce faisant, nous avons montré que non seulement la spectroscopie SFG est capable de détecter le processus de reconnaissance moléculaire mais qu'elle est également sensible à la sélectivité d'un tel processus. Nous avons alors pu comparer notre technique aux autres habituellement employées dans ce type d'expériences et montrer qu'elle présente toutes les qualités requises pour être utilisées dans ce but.

En ce qui concerne les perspectives, les résultats que nous avons obtenus dans l'étude de ce premier biocapteur-test se révèlent très prometteurs et nous ouvrent plusieurs champs d'investigation.

La première idée qui vient à l'esprit est une analyse encore plus poussée du complexe biotine-avidine. En effet, de nombreuses expériences sont encore à réaliser pour cerner complètement le système. Comme nous l'avons déjà men-

tionné, d'autres travaux réalisés au laboratoire LASMOS ont pour objectif l'étude d'autres gammes spectrales, travail rendu ardu par des conditions expérimentales plus difficiles. Une autre perspective intéressante serait l'étude in-situ du capteur. Le problème de réflexion totale également mentionné pourrait être contourné par l'utilisation de prismes réalisés en matériau à haut indice de réfraction comme le saphir. L'avantage d'un tel travail réside dans le fait qu'il nous donnerait accès aux cinétiques d'interaction entre la cible et la sonde. Le cas des métaux n'est pas à abandonner non plus puisque nous pourrions réaliser des dépôts de films minces sur la base du prisme afin d'utiliser une configuration expérimentale proche du TIR. En combinant ces deux dernières perspectives, il nous serait alors possible de travailler en conditions électro-chimiques, ce qui nous fournirait un paramètre supplémentaire pour contrôler la reconnaissance.

D'autre part, un second axe de recherche serait d'appliquer la spectroscopie SFG à d'autres biocapteurs plus complexes mais présentant plus d'intérêt pour la biologie que le système biotine-avidine déjà bien connu. Un bon exemple serait bien sûr les biocapteurs à base de brins d'ADN. En effet, ceux-ci semblent également prometteurs puisque l'interaction entre deux brins se fait principalement par ponts hydrogènes impliquant des groupements $N-H$. Plus important encore, nous savons que c'est lors de l'hybridation que la molécule d'ADN acquiert sa structure bien connue en forme de double hélice. Il y a fort à parier que les spectres SFG seront affectés par un tel changement dans la conformation de la couche de molécules sondes.

Cependant, il faut préciser que l'étude de biocapteurs telle qu'elle est développée ici, bien que présentant un intérêt fondamental évident, ne peut pas trouver d'application pratique dans la mesure où c'est la même molécule sonde qui est adsorbée sur toute la surface. Afin de réaliser un dispositif complet et performant tels que les biochips ADN, d'autres paramètres restent à maîtriser. Dans un premier temps, il nous faudrait déposer sur le substrat différentes molécules sondes sous forme de nano-plots. L'idée serait alors de réaliser une cartographie spatiale de la surface réalisée par microscopie SFG. Dans cette variante de la spectroscopie SFG classique, le signal est récolté en différents points de l'échantillon par une caméra CCD, dévoilant ainsi une image vibrationnelle de l'interface.

Au vu de ces différentes perspectives, nous pouvons conclure ce travail en disant qu'il constitue un premier pas encourageant dans le monde des biocapteurs mais que la route est encore longue avant de faire de la spectroscopie SFG une technique de pointe en matière de détection de reconnaissance moléculaire.

Bibliographie

- [1] M. A. Johnson, A. L. Betz, R. A. McLaren, E. C. Sutton, and C. H. Townes. *Astrophys. J.*, 208 :L145, 1976.
- [2] T. H. Maiman. *Phys. Rev. Lett.*, 4 :564, 1960.
- [3] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich. *Phys. Rev. Lett.*, 7 :118–119, 1961.
- [4] L. Landau and E. Lifchitz. *Electrodynamique des milieux continus*. éditions Mir, 1969.
- [5] P. A. Thiry. *Cours d’optique non linéaire*. FUNDP, 2004.
- [6] P. A. Thiry. *Introduction à l’optique non linéaire*. Müllerthal, 1999.
- [7] M. Bass, P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich. *Phys. Rev. Lett.*, 8 :18, 1962.
- [8] F. Brown, R. E. Parks, and A. M. Sleeper. *Phys. Rev. Lett.*, 14 :1029, 1965.
- [9] P. Guyot-Sionnest, J. H. Hunt, and Y. R. Shen. *Phys. Rev. Lett.*, 59 :1597, 1987.
- [10] Y. R. Shen. *Nature*, 337 :519, 1989.
- [11] Y. R. Shen. *The Principles of Nonlinear Optics*. John Wiley and Sons Ltd, 1984.
- [12] N. Bloembergen. *Nonlinear Optics*. W. A. Benjamin Inc., 1965.
- [13] R. L. Sutherland. *Handbook of Nonlinear Optics*. Marcel Dekker Inc., 2003.
- [14] F. Sanchez. *Optique non linéaire*. Ellipses Ed., 1999.
- [15] A. Tadjeddine and A. Peremans. *Spectroscopy for Surface Science*. John Wiley and Sons Ltd, 1998.
- [16] Ch. Humbert. PhD thesis, FUNDP, 2003.
- [17] Namur, un outil aux multiples applications. *Le Soir*, 3 avril 2000.
- [18] Ph. Hollander. PhD thesis, FUNDP, 2001.

- [19] A. A. Mani. PhD thesis, FUNDP, 2004.
- [20] A. A. Mani, Ph. Hollander, P. A. Thiry, and A. Peremans. *Appl. Phys. Lett.*, 75 :3066, 1999.
- [21] A. A. Mani, L. Dreesen, Ph. Hollander, P. A. Thiry, and A. Peremans. *Proceedings of Photomec'99 (European Workshop, Liege, Belgium)*.
- [22] K. A. Stankov. *Appl. Phys. B*, 45 :191, 1988.
- [23] J. Monod. *Le hasard et la nécessité*. 1970.
- [24] L. Häusling, H. Ringsdorf, F. J. Schitt, and W. Knoll. *Langmuir*, 7 :1837–1840, 1991.
- [25] S. Roy, J. H. Kim, J. T. Kellis Jr., A. J. Poulouse, C. H. Robertson, and A. P. Gast. *Langmuir*, 18 :6319–6323, 2002.
- [26] L. Ramdas and W. Zhang. *Biophotonics*, 9 (3) :38, 2002.
- [27] R. De Paris, T. Strunz, K. Oroszlan, H. J. Güntherodt, and M. Hegner. *Single Mol.*, 1 :285–290, 2000.
- [28] Y. S. Lo, N. D. Huefner, W. S. Chan, F. Steven, J. M. Harris, and T. P. Beebe Jr. *Langmuir*, 15 :1373–1382, 1999.
- [29] N. Lala, A. G. Chittiboyina, S. P. Chavan, and M. Sastry. *M. Col. and Surf. A*, 205 :15–20, 2002.
- [30] M. Sastry, N. Lala, V. Patil, S. P. Chavan, and A. G. Chittiboyina. *Langmuir*, 14 :4138–4142, 1998.
- [31] J. Clarkson, C. Sudworth, S. I. Masca an D. N. Batchelder, and D. A. Smith. *J. Raman Spectrosc.*, 31 :373–375, 2000.
- [32] A. Torreggiani and G. Fini. *J. Mol. Struct.*, 480 :459–463, 1999.
- [33] C. M. Yam, C. M. Pradier, M. Salmain, N. Fischer-Durand, and G. Jaouen. *J. Colloid Interface Sci.*, 244 :1–4, 2001.
- [34] C. M. Pradier, M. Salmain, L. Zheng, and G. Jaouen. *Surf. Sci.*, 502 :192–202, 2002.
- [35] Y. Hiller, E. A. Bayer, and M. Wilchek. *Biochem. J.*, 278 :573, 1991.
- [36] R. B. Honzatko and R. W. Williams. *Biochem. J.*, 21 :6201, 1982.
- [37] L. Pugilese, A. Coda, M. Malcovati, and M. Bolognesi. *J. Mol. Biol.*, 231 :698, 1993.
- [38] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, and F. R. Salemme. *Science*, 243 :85, 1989.
- [39] Pharmacorama Website. www.pharmacorama.com.
- [40] C.-M. Pradier, M. Salmain, L. Zheng, and G. Jaouen. *Surface Science*, 502 :193, 2002.

- [41] A. Ulman. *Chem. Rev.*, 96 :1533–1554, 1996.
- [42] D. L. Allara and R. G. Nuzzo. *Langmuir*, 1 :52–66, 1985.
- [43] Th. Wink, S. J. van Zuilen, and W. P. van Bennekom. *Analyst*, 122 :43R–50R, 1997.
- [44] L. Dreesen, C. Humbert, M. Celebi, J. J. Lemaire, A. A. Mani, P. A. Thiry, and A. Peremans. *Appl. Phys. B*, 74 :621–625, 2002.
- [45] C. Humbert, M. Buck, A. Calderone, J.-P. Vigneron, V. Meunier, B. Champagne, Wan-Quan Zheng, A. Tadjeddine, P. A. Thiry, and A. Peremans. *Phys. Stat. Sol. (a)*, 175 :129–136, 1999.
- [46] C. M. Pradier, M. Salmain, Z. Liu, and C. Méthivier. *Surf. Interface Anal.*, 34 :67–71, 2002.
- [47] L. Dreesen, Y. Sartenaer, C. Humbert, A. A. Mani, J. J. Lemaire, C. Méthivier, C. M. Pradier, P. A. Thiry, and A. Peremans. *Thin Solid Films*, 464-465(373-378), 2004.
- [48] D. Duvivier. Master’s thesis, FUNDP, 2004.
- [49] Y. Sartenaer, L. Dreesen, C. Humbert, A. A. Mani, J. J. Lemaire, M. Salmain, C. M. Pradier, P. A. Thiry, and A. Peremans. *Physicalia Mag.*, 25 :221–229, 2003.
- [50] L. Dreesen, Y. Sartenaer, C. Humbert, A. A. Mani, C. Méthivier, C. M. Pradier, P. A. Thiry, and A. Peremans. *ChemPhysChem*, 5 :1–8, 2004.

Table des figures

1.1	<i>Atome diélectrique neutre (à gauche) et soumis à un champ électrique extérieur (à droite)</i>	8
1.2	<i>Les principaux phénomènes optiques du second ordre</i>	14
2.1	<i>Différents vecteurs d'onde impliqués dans la génération de fréquence-somme dans un milieu non linéaire semi-infini de limite $y = 0$</i>	21
3.1	<i>Dispositif laser développé au LASMOS et utilisé pour la spectroscopie SFG</i>	29
3.2	<i>Schéma des niveaux d'énergie du Nd :YAG</i>	30
3.3	<i>Différentes configurations expérimentales utilisées :(a) configuration classique (b) configuration en réflexion totale</i>	35
3.4	<i>Chaîne de détection utilisée en spectroscopie SFG</i>	36
4.1	<i>Représentation schématique d'un biocapteur (a) en présence d'une solution de molécules cibles présentant une affinité pour les sondes; (b) en présence d'une solution de molécules cibles ne présentant pas d'affinité</i>	40
4.2	<i>Représentation schématique d'un biochip ADN avant et après interaction avec une solution d'ADN cibles. Dans ce cas, le biochip détecte la présence des gènes A1, C3, D5, F1, G3 et G6.</i>	42
4.3	<i>Représentation schématique et stéréoscopique de la molécule de biotine ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$)</i>	43
4.4	<i>Représentation schématique et stéréoscopique de la biocytine ($C_{16}H_{28}N_4O_4S$) composée d'une biotine ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) et d'une lysine ($C_6H_{14}N_2O_2$)</i>	44
4.5	<i>Structure tétramérique de l'avidine et représentation schématique des quatre monomères sous forme de prismes hexagonaux (Figure adaptée de [47])</i>	46
5.1	<i>Courbe de transmission du CaF_2</i>	51

5.2	<i>Spectres SFG de l'interface biocytine/métal</i>	53
5.3	<i>Défaut gauche et rupture de symétrie dans une molécule simple, le dodécanethiol</i>	54
5.4	<i>Spectres SFG de l'interface biocytine/métal après immersion dans une solution d'avidine</i>	55
5.5	<i>Spectres SFG de l'interface biocytine/CaF₂</i>	56
5.6	<i>Spectres SFG de l'interface biocytine/CaF₂ après immersion dans une solution d'avidine</i>	57
5.7	<i>Schéma de principe de la poche de liaison de l'avidine montrant les acides aminés intervenant dans les liaisons par ponts hydrogènes (Figure adaptée de [47])</i>	58
5.8	<i>Tableau récapitulatif des spectres SFG obtenus sur substrat de CaF₂ (a) après formation de la monocouche de biocytine; et après immersion de cette couche (b) dans une solution d'avidine; (c) dans une solution d'avidine saturée; (d) dans une solution de BSA (Figure adaptée de [49])</i>	61
5.9	<i>Comparaison entre les spectres SFG (en haut) et FT-IRRAS (en bas) d'une monocouche de biocytine adsorbée sur CaF₂ (Figure adaptée de [50])</i>	62
5.10	<i>Spectre FT-IRRAS d'une monocouche de biocytine adsorbée sur CaF₂ (Figure adaptée de [50])</i>	63
5.11	<i>Spectres FT-IRRAS de l'interface biocytine/CaF₂ (a) après formation de la monocouche de biocytine; et après immersion de cette couche (b) dans une solution d'avidine; (c) dans une solution d'avidine saturée (Figure adaptée de [50])</i>	63
5.12	<i>Comparaison des performances des principales techniques de détection utilisées pour les biocapteurs</i>	64